



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

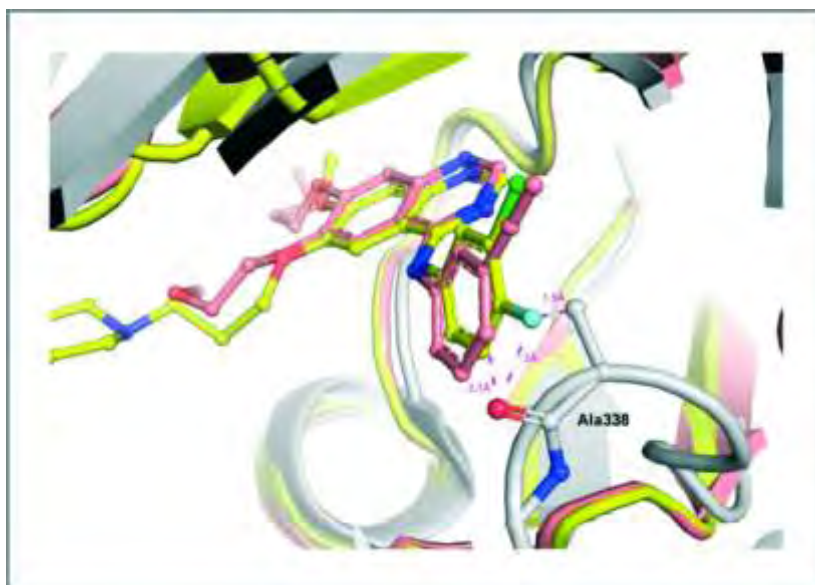
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΗΜΗΤΡΑ ΖΕΡΒΑ

Διπλωματική Εργασία

**«ΑΛΟΓΟΝΟΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΡΟΛΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ,
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΪΪΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ»**



Λάρισα 2013

Διπλωματική Εργασία

**«ΑΛΟΓΟΝΟΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΡΟΛΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ,
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΪΪΚΗ ΑΠΟΤΙΜΙΣΗ»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης — Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του, όπως επίσης και την διδάσκουσα και επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, κα. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράσταση, καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη την περίοδο που βρισκόμουν υπό την επίβλεψή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιο-Οργανικής Χημείας για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν .

Τέλος, ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιο-Οργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήθηκε εντός του εργαστηριακού χώρου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη σύνθεση και βιολογική αποτίμηση αλογονοφαινυλο-πυρρολών. Μετά από εισαγωγικά στοιχεία σχετικά με τους βιολογικούς κινδύνους στους οποίους στοχεύουν οι παραγόμενες ενώσεις (καρκίνος, οξειδωτικό στρες), ακολουθεί περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Αρχικά παρασκευάστηκε το ενδιάμεσο προϊόν με μία αντίδραση τριών συστατικών σε ένα στάδιο. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα δύο τελικά επιθυμητά προϊόντα με σύζευξη του ενδιάμεσου προϊόντος, 2,3-διοξοπυρρολιδίνης και της ο-φαινυλο-διαμίνης. Τα τελικά προϊόντα αποτιμήθηκαν ως προς την αντικαρκινική, αντιοξειδωτική και αντιϊική τους δράση. Οι δομές των προϊόντων ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR.

ABSTRACT

The main focus of the present thesis was the synthesis and biological assays of alogenophenyl-pyrroles. After a few introductory elements regarding the biological hazards which the derived compounds are aimed to be used against (cancer, oxidative stress), follows a description of the experiments that took place. Initially, an intermediate product was formed in a three reagents, one stage reaction. Afterwards, two final, desired products were synthesized with the conjugation of the intermediate product, 2,3-dioxopyrrolidine to o-phenyl diamine. The final products were assayed about their anticancer, anti-oxidant and antiviral function. The structures of all the newly synthesized products were determined by using NMR spectroscopy.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Καρκίνος: η επάρατη νόσος	9
1.1.1 Γενετική των καρκινικών κυττάρων	9
1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα	11
1.1.3 Περιστατικά καρκίνου	12
1.1.4 Ανάπτυξη φαρμάκων για καταπολέμηση του καρκίνου	13
1.1.5 Μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι των καρκινικών κυττάρων	14
1.2 Οξειδωτικό στρες-Αντιοξειδωτικά-Καταπολέμηση	15
1.2.1 Οξειδωτικό στρες	15
1.2.2 Αντιοξειδωτικά-Καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες	15
1.3 Πυρρολινόνες	19
1.3.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολινολικό δακτύλιο και εφαρμογή τους στην φαρμακολογία	20
1.3.2 Σύνθεση των πυρρολινονών	21
1.4 Πυρρολιδίνες	22
1.4.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο και βιολογική δράση	24
1.5 Κιναζολινικά και κινολαλινικά παράγωγα	29
1.5.1 Γενικά	29
1.5.2 Τα κιναζολινικά και κινολαλινικά παράγωγα ως αντικαρκινικοί παράγοντες	30
1.5.3 Μοριακά στοχευμένη θεραπεία με τη χρήση κιναζολινικών και κινολαλινικών παραγώγων	31
2. ΣΚΟΠΟΣ	36
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (Thin Layer Chromatography)	37
3.2 Χρωματογραφία στήλης	38
3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων	39
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού	41
4.1.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1Η-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα	44
4.1.2 Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1Η-πυρρολο-[2,3-b]κινολαλιν-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα και του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλο)-1-μεθυλο-1Η-πυρρολο-[2,3-b]κινολαλιν-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα	46
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49

5.1 Αντιοξειδωτική δράση	49
5.2 Αντικαρκινική δράση	53
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΚΡΩΝΥΜΙΩΝ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος : η επάρατη νόσος

1.1.1 Γενετική των καρκινικών κυττάρων

Στο ανθρώπινο σώμα, τα κύτταρα συνεχώς πεθαίνουν και αντικαθίστανται. Φυσιολογικά, το σώμα δημιουργεί καινούρια κύτταρα αντιγράφοντας τα παλαιότερα. Σε σπάνιες περιπτώσεις όμως, κατά την αντιγραφή ενσωματώνονται “λάθη” στα νεοσχηματισμένα κύτταρα. Εάν το λάθος συμβεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου, αυτό ονομάζεται “μετάλλαξη”. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι ακίνδυνες και το αποτέλεσμα τους εξαρτάται από το εάν συμβούν σε ζωτικής σημασίας γονίδιο ή όχι. Οι περισσότερες των μεταλλάξεων είναι ακίνδυνες καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό του συνόλου του γενετικού υλικού αποτελεί “λειτουργικά” γονίδια (κατά προσέγγιση μόνο το 1,5% του συνολικού γονιδιώματος κωδικοποιεί “λειτουργικά” γονίδια, και ο αριθμός των “λειτουργικών” γονιδίων όπως αυτός περιγράφεται στο *Human Genome Project* είναι περίπου 30.000). Κατά συνέπεια, η πιθανότητα οποιαδήποτε δεδομένη μετάλλαξη να συμβεί σε ένα σημαντικό γονίδιο και να οδηγήσει σε αλλαγές στην λειτουργία ή σε προϊόντα του κυττάρου είναι σχετικά μικρή. Συνήθως, χρειάζονται πολλά σετ μεταλλάξεων για να δημιουργηθεί ένα αθροιστικό αποτέλεσμα το οποίο θα τροποποιήσει τα κύτταρα. Όμως, η πιθανότητα να επηρεαστεί ένα κύτταρο αυξάνεται εάν η πρώτη μετάλλαξη συμβεί σε γονίδιο που ευθύνεται για την αποτροπή ή επιδιόρθωση άλλων μεταλλάξεων. Επιπροσθέτως, λόγω αποτελεσματικών αυτο-διορθωτικών μηχανισμών που σχεδόν όλοι οι επιτυχημένοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει, οι περισσότεροι καρκίνοι που προέρχονται από αυτή τη διαδικασία αθροιστικών μεταλλάξεων είναι σποραδικοί και δεν κληροδοτούνται στις επόμενες γενιές.

Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου η μετάλλαξη συμβαίνει σε γαμετικά κύτταρα, μπορεί να κληροδοτηθεί στους απογόνους του οργανισμού. Αυτές οι μεταλλάξεις αποτελούν το περίπου 3-5% του συνολικών περιπτώσεων καρκίνου. Συνηθέστερα,

συμβαίνουν όταν τα κύτταρα των ωοθηκών και των όρχεων, στα οποία δημιουργούνται τα ωάρια και το σπέρμα, περιέχουν τη μετάλλαξη, και όταν ο οργανισμός αναπαράγεται αυτές οι μεταλλάξεις κληρονομούνται στους απογόνους. Παρόλο που γενικά μία μετάλλαξη από μόνη της δεν οδηγεί σε καρκίνο, άνθρωποι που έχουν κληρονομήσει τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι ένα βήμα πιο κοντά στο να αναπτύξουν καρκίνο σε σχέση με ανθρώπους που δεν έχουν τέτοια διαφοροποιημένα γονίδια. Μερικές ευρέως γνωστές καρκινικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν αυτές που βρίσκονται σε κάποια από τα συγκεκριμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται με ρυθμίσεις πρωτεϊνικής έκφρασης όπως τα BRCA1 και BRCA2 στον καρκίνο του στήθους και των ωοθηκών, και πρωτο-ογκογονίδια όπως το RET στον καρκίνο του κόλον (Πίνακας 1).

Επίκτητες μεταλλάξεις συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου και δεν μεταβιβάζονται από τον γονέα στο παιδί. Η χρήση καπνού ή η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ιούς, το γήρας, και άλλοι παράγοντες είναι συχνά αίτια επίκτητων μεταλλάξεων οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν "σποραδικό καρκίνο", ο οποίος είναι πολύ πιο συνηθής από ότι οι κληρονομήσιμοι τύποι καρκίνου. Σε ανθρώπους με σποραδικό καρκίνο, ορισμένα κύτταρα του σώματός τους (σωματικά κύτταρα) αναπτύσσουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκίνο. Ακόμη, στον σποραδικό τύπο καρκίνου, μόνο τα κύτταρα του όγκου περιέχουν αυτές τις βλαβερές μεταλλάξεις. Εν αντιθέσει, στον κληρονομικό καρκίνο, κάθε κύτταρο στο σώμα του ανθρώπου περιέχει την μετάλλαξη, καθώς κάθε κύτταρο προέρχεται από το γαμετικό κύτταρο με το μεταλλαγμένο(α) γονίδιο(α). Όπως και στον σποραδικό καρκίνο, ένα σύνολο περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων ευθύνονται για τον οικογενειακό ή κληρονομικό τύπο καρκίνου. Στον Πίνακα 1 φαίνονται μερικά από τα γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο στους ανθρώπους. (R. Paulmurugan, 2012)

<i>Gene Name</i>	<i>Type of Gene</i>	<i>Syndrome</i>
<i>BRC1 and BRC2</i>	<i>DNA repair genes</i>	<i>Hereditary Breast/Ovarian Cancer</i>
<i>MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2</i>	<i>DNA repair genes</i>	<i>Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer syndrome (HNPCC)</i>
<i>RET (Rearranged during transfection)</i>	<i>Proto- oncogene</i>	<i>Multiple Endocrine Neoplasia type 2a and 2b</i>
<i>PTEN</i>	<i>Tumor suppressor gene</i>	<i>Cowden syndrome</i>
<i>VHL μετάλλαξη στο 3P25.3:</i>	<i>Tumor suppressor gene</i>	<i>Renal angioma, renal cell carcinoma</i>
<i>p53 tumor suppressor gene</i>	<i>Tumor suppressor gene</i>	<i>Li-Fraumeni syndrome, breast cancer, brain tumors</i>
<i>Autosomal recessive genetic disorder</i>	<i>DNA repair genes</i>	<i>Xeroderma pigmentosa, metastatic malignant melanoma and squamous cell carcinoma</i>

Πίνακας 1: Ελάττωμα σε σημαντικά κυτταρορυθμιστικά γονίδια οδηγεί σε κληρονομικούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. (R. Paulmurugan, 2012)

1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα

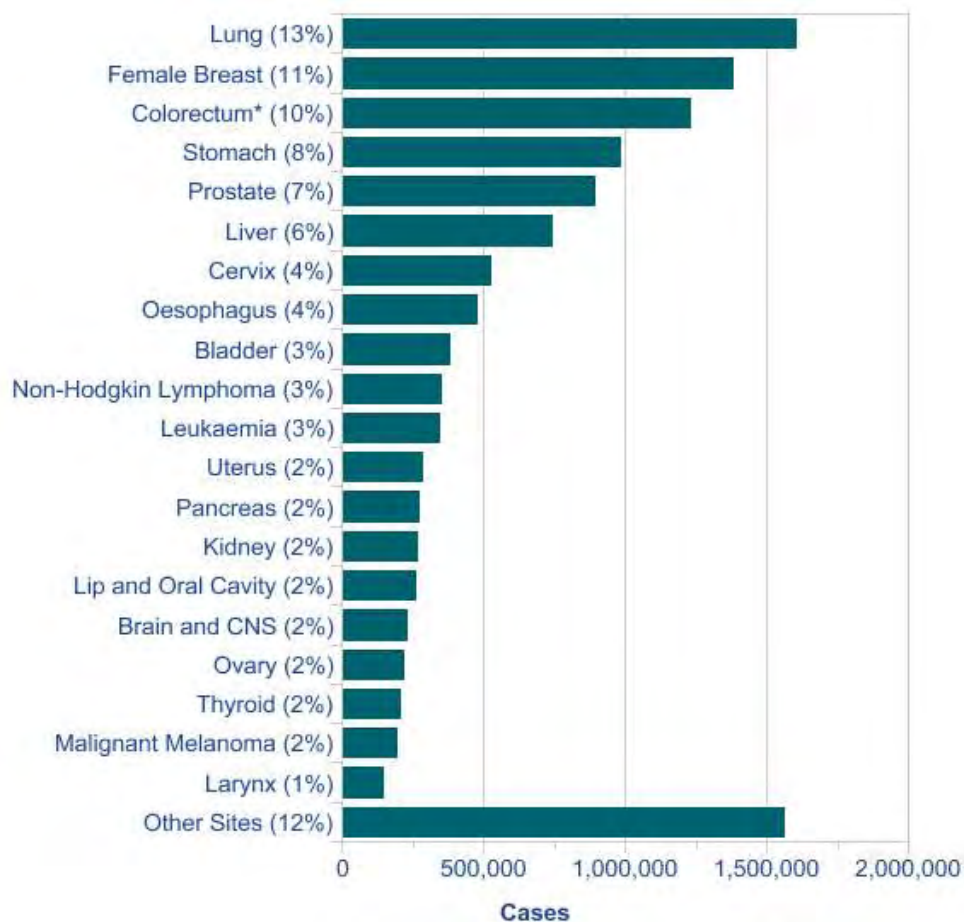
Οι φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες διαχειρίζονται και συντηρούνται από ένα δίκτυο συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αρκετών κυτταρικών μονοπατιών, τα οποία περιλαμβάνουν κυτταρικές κυκλικές πρωτεΐνες, ελεγχόμενη αποπτωτική διαδικασία, λειτουργικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, υπεύθυνους κυτταρικούς υποδοχείς, ελεγχόμενο δίκτυο μεταφοράς σημάτων και ενεργούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA. Όλα μαζί, αυτά τα μονοπάτια δημιουργούν αυτό που είναι γνωστό ως οι «έξι σημαντικοί κανόνες», απαιτούμενοι για τη συντήρηση των κυττάρων σε φυσιολογική κατάσταση. Ο κληρονόμος διατηρεί την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, αλλά εάν υπάρξει μία σημαντική ρωγμή σε οποιονδήποτε από τους μηχανισμούς αυτού του κυκλώματος, μπορεί να οδηγήσει σε μία παθολογική κατάσταση του κυττάρου η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Επιπροσθέτως, κάθε ένας από αυτούς τους μηχανισμούς ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε αντιπαράθεση με τους έξι σημαντικούς κανόνες που απαιτούνται για τη διατήρηση

των κυττάρων σε φυσιολογική κυτταρική κατάσταση, η ανάπτυξη του καρκίνου περιλαμβάνει μεταλλαγμένες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, ενεργοποιημένη αγγειογένεση, απενεργοποιημένα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, ενεργό σήμα ανάπτυξης (growth signaling), και ανεπαρκή συστήματα επιδιόρθωσης DNA. (R. Paulmurugan, 2012)

1.1.3 Περιστατικά καρκίνου

Τα στατιστικά στοιχεία δείχνουν διπλασιασμό των περιστατικών καρκίνου τα τελευταία 20 χρόνια. Κάποιες από τις κυρίαρχες προτεινόμενες αιτίες που σχετίζονται με την εξάπλωση του καρκίνου περιλαμβάνουν αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως η αυξημένη χρήση διατηρημένων τροφών με χημικά συντηρητικά και διευρυμένη ημερήσια έκθεση σε διαφορετικές καρκινογόνες χημικές ενώσεις. Οι πιο συχνά διαγνωσμένοι τύποι καρκίνου παγκοσμίως σύμφωνα με εκτιμήσεις για το 2008 παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

Προς το παρόν, η πρόληψη είναι το κλειδί για τη μείωση των περιστατικών καρκίνου και των θανάτων που συνδέονται με αυτόν. Σήμερα, οι κύριες μέθοδοι πρόληψης και θεραπείας είναι η έγκαιρη διάγνωση (υπέρηχος, CT, MRI, PET, SPECT), η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και οι θεραπείες με ακτινοβολία. Για τις σχετικά λίγες περιπτώσεις καρκίνου που γνωρίζουμε ότι προκαλούνται από μολυσματικά στελέχη (infectious agents), υπάρχει η δυνατότητα χρήσης προληπτικών εμβολίων. (R. Paulmurugan, 2012)



Εικόνα 1: Οι 20 Πιο Συχνά Διαγνωσμένοι Τύποι Καρκίνου Παγκοσμίως, Εκτίμηση 2008. (Ferlay et al, 2008)

1.1.4 Ανάπτυξη φαρμάκων για καταπολέμηση του καρκίνου

Για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά του καρκίνου, είναι πολύ σημαντικό να αναγνωριστεί ένας ή περισσότεροι μοριακοί στόχοι που να είναι διαφορετικοί ειδικά στα καρκινικά κύτταρα και να μην είναι διαθέσιμοι, ή να είναι διαθέσιμοι σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου όπως είναι οι EGFR και VEGFR και η ιντεγκρίνη, ή άλλους μηχανισμούς όπως η σύνθεση του DNA ή καταστολείς του μεταλλαγμένου όγκου και ενεργοποιημένα ογκογονίδια. Ακόμη, ο καρκίνος είναι ετερογενούς φύσης, οπότε οι αναγνωρισμένοι μοριακοί στόχοι για έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου μπορεί να μην είναι αποτελεσματικοί για κάποιον άλλο τύπο. Έτσι, απαιτείται ειδική στόχευση συγκεκριμένων μεμονωμένων ειδών

καρκίνου, ή ίσως είναι δυνατή η αναγνώριση ενός κοινού μηχανισμού που να είναι αποτελεσματικός για μια πληθώρα τύπων καρκίνου. Η επιτυχημένη ανάπτυξη φαρμάκων κατά του καρκίνου απαιτεί την συνεργασία ειδικών σε διαφορετικά πεδία, συμπεριλαμβανομένων της βιοχημείας, κυτταρικής βιολογίας, μοριακής βιολογίας, και κλινικούς ειδικούς. (R. Paulmurugan, 2012)

1.1.5 Μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι των καρκινικών κυττάρων

Έχουν ταυτοποιηθεί και ερευνηθεί πολλοί διαφορετικοί τύποι μοριακών στόχων με σκοπό την ανάπτυξη και εφαρμογή φαρμάκων κατά του καρκίνου. Οι πρωτεύοντες στόχοι περιλαμβάνουν ενεργοποιημένες ογκογενετικές πρωτεΐνες ή μεταλλαγμένα μη-λειτουργικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως στόχοι για τη θεραπεία τα ειδικά χαρακτηριστικά του ιστού ή η διαφοροποίηση στο μονοπάτι. Για παράδειγμα, το οιστρογόνο δρα ως μιτογόνο στον ιστό του στήθους και είναι υπερδραστήριο στα καρκινικά κύτταρα του στήθους. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει μέσω ενός στεροειδούς υποδοχέα που ονομάζεται υποδοχέας οιστρογόνου (ER). Η αναστολή της δράσης των οιστρογόνων (με τη χρήση αντι-οιστρογόνου όπως είναι το tamoxifen), έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας των ER-θετικών καρκίνων του στήθους. Ομοίως, το διαφοροποιημένο μονοπάτι που ξεκινά από τα διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα (hematopoietic lineage) έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της προμυελοκυτικής λευχαιμίας (promyelocytic leukemia). Σε αυτήν την στρατηγική, κύτταρα σε καλοήγη κατάσταση προκαλούνται να προωθήσουν την ωρίμανση και διαφοροποίηση κυττάρων, ώστε να αποκτήσουν κακοήγη φαινότυπο. Ακολουθεί θεραπεία με στελέχη τα οποία μπορούν, μέσω ρύθμισης των γονιδίων, να προκαλέσουν απόπτωση και έτσι να "σκοτώσουν" αποτελεσματικά τα ογκοκύτταρα. Η οξεία προμυελοκυτική λευχαιμία, ένας τύπος της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (myeloid leukemia), θεραπεύεται αποτελεσματικά με αυτή την τεχνική. Η χρήση του all-trans ρετινοϊκού οξέος (ATRA) έχει έτσι μετατρέψει ένα θανατηφόρο είδος λευχαιμίας σε έναν θεραπεύσιμο τύπο καρκίνου. (R. Paulmurugan, 2012)

1.2 Οξειδωτικό στρες – Αντιοξειδωτικά – Καταπολέμηση

1.2.1 Οξειδωτικό στρες

Η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, με πιθανή ανάπτυξη προβλημάτων στον οργανισμό, ορίζεται ως "αντιοξειδωτικό στρες". (Helmut, 1997)

Το οξειδωτικό στρες είναι μία μεταβολική κατάσταση όπου οι κυτταρικές αντιδράσεις οξείδωσης βρίσκονται εκτός ελέγχου. Υπό αυτές τις συνθήκες μπορεί να συσσωρευτεί υπεροξείδιο ($O_2^{\cdot-}$), οδηγώντας στον σχηματισμό υδροξυλίων OH^{\cdot} . Αυτό είναι μια ελεύθερη ρίζα η οποία αποσπά υδρογόνα από τους διπλούς δεσμούς ακόρεστων λιπαρών οξέων. Κατά συνέπεια, το λιπαρό οξύ μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα η οποία αντιδρά εύκολα με οξυγόνο προς σχηματισμό υπεροξειδικής ρίζας. Αυτό με τη σειρά του θα αποσπάσει υδρογόνο από ένα ακόμη λιπαρό οξύ, δημιουργώντας μία συνεχιζόμενη αλυσιδωτή αντίδραση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξείδωση. Το DNA, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες μπορεί επίσης να οξειδωθούν. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να παίζει ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου, της αθηροσκλήρωσης, στην καταστροφή του ισχαιμικού ιστού και σε φλεγμονές. Πιθανώς τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό του οξειδωτικού στρες. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι υψηλή λήψη βιταμίνης E συνδέεται με τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης της στεφανιαίας καρδιακής νόσου. (Henriksen T., Endresen M., 1994)

1.2.2 Αντιοξειδωτικά – Καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες

Σύμφωνα με τους Halliwell & Gutteridge (1989) αντιοξειδωτική είναι «οποιαδήποτε ουσία η οποία, όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις συγκριτικά με τη συγκέντρωση ενός υποστρώματος το οποίο οξειδώνεται εύκολα, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει ενώσεις μη-ενζυματικής καθώς και ενζυματικής φύσης. Η

ποικιλομορφία των αντιοξειδωτικών ταιριάζει ξεκάθαρα με αυτή των προ-οξειδωτικών (ενώσεις που προκαλούν οξειδωτικό στρες). (Helmut, 1997)

Πρόληψη

Η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι η παρεμπόδιση της δημιουργίας τους. Υπάρχουν πολλές στρατηγικές στην βιολογία σχεδιασμένες για την αποφυγή του οξειδωτικού στρες, ξεκινώντας από το πλαγκτόν που κατεβαίνει από την επιφάνεια της θάλασσας σε χαμηλότερα επίπεδα ηλιακής ακτινοβολίας, έως το πακετάρισμα του DNA σε χρωματίνη για την προστασία του γενετικού υλικού προσδίδοντας εναλλακτικούς στόχους. Τα μικρόβια έχουν αναπτύξει ειδικευμένες τεχνικές ώστε να αποφεύγουν την βασισμένη στο οξυγόνο θανάτωσή τους από φαγοκύτταρα.

Όσον αφορά τον σχηματισμό ριζών, πρέπει πρώτα να αναφερθεί ότι κάποια από τα ένζυμα που έχουν τον κίνδυνο δημιουργίας ελεύθερων ριζών είναι μεγαλοφυώς σχεδιασμένα. Η οξειδάση των κυτοχρωμάτων, η οποία εκτελεί το μεγαλύτερο μέρος της μείωσης του κυτταρικού οξυγόνου, δεν απελευθερώνει υπεροξείδιο ή άλλες ελεύθερες ρίζες, αν και περιέχει σίδηρο και ιόντα χαλκού. Ομοίως, η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου ριβονουκλεοτιδική αναγωγή εμποδίζει την εξάπλωση του ριζικού χαρακτήρα της τυροσίνης στη Β υπομονάδα του ενζύμου στο περιβάλλον σχηματίζοντας ένα κατάλληλο "κελί".

Η προστασία των κυττάρων από περιστατική ραδιενέργεια μπορεί να επιτευχθεί με εξειδικευμένες χρωστικές, π.χ. με τις μελανίνες για την υπεριώδη ακτινοβολία ή με τα καροτενοειδή για ηλεκτρονιακώς προκαλούμενες καταστάσεις όπως το μονοατομικό οξυγόνο. Όμως, αυτές και άλλες στρατηγικές δεν είναι εντελώς προληπτικές, επειδή λειτουργούν μειώνοντας την παραγωγή ενός δεδομένου παράγοντα με απόδοση μικρότερη του 100%. (Helmut, 1997)

Αναχαίτιση

Μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Αυτός είναι ο τομέας των οξειδωτικών όπως ορίζονται σε μία πιο στενή έννοια. Το βασικό πρόβλημα είναι η αναχαίτιση των βλαβερών στελεχών, όταν αυτά σχηματιστούν, ώστε να αποτραπούν περεταίρω

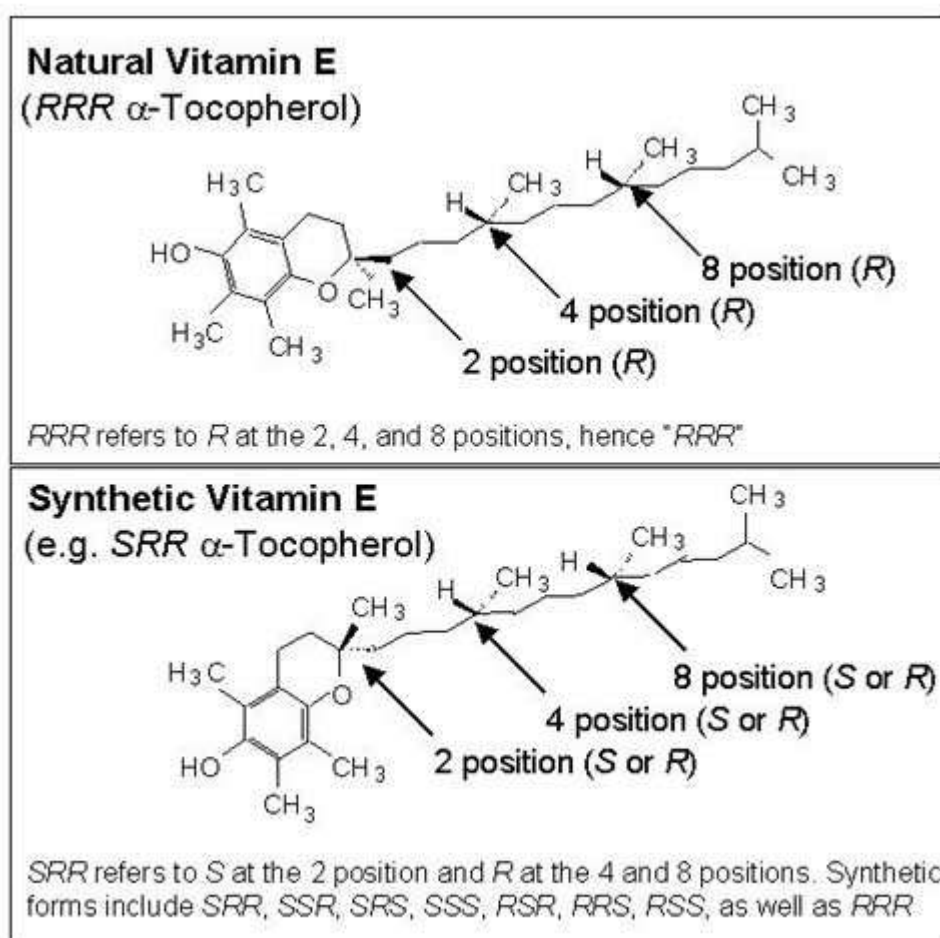
βλαβερές αντιδράσεις. Αυτή είναι η διαδικασία της απενεργοποίησης. Για ριζικές ενώσεις η τελική απενεργοποίηση αποτελείται από την δημιουργία μη-ριζικών και μη-ενεργών τελικών προϊόντων. Λόγω της φύσεως των ελεύθερων ριζών, υπάρχει μία τάση προς αλυσιδωτές αντιδράσεις, π.χ. μία ένωση η οποία μεταφέρει ένα αδεσμικό ηλεκτρόνιο θα αντιδράσει με μία άλλη ένωση ώστε να αφήσει το αδεσμικό της ηλεκτρόνιο σε αυτήν την ένωση ("τα ριζικά δημιουργούν ριζικά").

Ένας δεύτερος βιολογικής σημασίας στόχος είναι η μεταφορά της ριζικής λειτουργίας μακριά από ευαίσθητες περιοχές-στόχους, προς μέρη του κυττάρου όπου η πρόκληση οξειδωτικού στρες θα ήταν λιγότερο βλαβερή. Γενικά, αυτό περιλαμβάνει την μεταφορά των οξειδωτικών ισοδύναμων από τις υδρόφοβες φάσεις σε υδατικές φάσεις, π.χ. από τη μεμβράνη στο ενδοκυτταρικό υγρό ή από τις λιποπρωτεΐνες στην υδατική φάση του πλάσματος. Από βιολογική άποψη, τα πιο αποτελεσματικά αναχαιτιστικά αντιοξειδωτικά συνδυάζουν τις βέλτιστες ιδιότητες και για τους δύο αυτούς στόχους: πρώτον, αντιδρούν με αρχικές ελεύθερες ρίζες, όπως είναι οι λιπιδικές υπερόξυ ρίζες, σε κατάλληλες ποσότητες, και δεύτερον, μπορούν και αλληλεπιδρούν με υδατοδιαλυτές ενώσεις ώστε να αυτό-ανανεώνονται. Αυτή η συνδυαστική δράση μεταφέρει τη ριζική λειτουργία μακριά από περεταίρω πιθανούς στόχους. Στις βιολογικές μεμβράνες, όπου υπάρχει ένα υψηλής αποτελεσματικότητας σύστημα υποστήριξης, μπορεί να είναι αναγκαία μόνο 1-3 αντιοξειδωτικά μόρια ανά 1000 πιθανούς μοριακούς στόχους.

Τέτοια αναχαιτιστικά αντιοξειδωτικά είναι συχνά φαινολικά παράγωγα. Η (R,R,R)- α -Tocopherol είναι πιθανότατα η πιο αποτελεσματική ένωση στη φάση των λιπιδίων. (Εικόνα 2).

Προαπαιτούμενο για αποτελεσματική αναχαίτιση από τα φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι ότι ο χρόνος ζωής της αναχαιτιζόμενης ρίζας δεν πρέπει να είναι πολύ μικρός. Άρα, εφόσον ο χρόνος ζωής τους εκτείνεται στο εύρος των δευτερολέπτων, οι υπερόξυ ρίζες είναι πολύ καλές υποψήφιες για αντίδραση. Αντιθέτως, η υδροξυλική ρίζα, με την υψηλή αντιδραστικότητα που την χαρακτηρίζει και ιδιαίτερα μικρό χρόνο ζωής, δεν μπορεί να αναχαιτιστεί αποτελεσματικά. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 100mm αναχαιτιστικής ένωσης θα χρειαζόνταν για 90% απόδοση, αποκλείοντας την αναχαίτιση ως χρήσιμη στρατηγική ενάντια στις υδροξυλικές ρίζες,

εκτός και αν είναι για ωσμοτικούς λόγους. Τέτοιες ενώσεις με υψηλή αποτελεσματικότητα όσον αφορά στο μονομοριακό οξυγόνο, κυρίως καρροτενοειδή και οξυ-καρροτενοειδή, αποτελούν ένα κατάλληλο σύστημα αντιμετώπισης των ριζών οξυγόνου, παρά την αντιδραστικότητα και τον μικρό χρόνο ζωής του. Οι τοπικές συγκεντρώσεις των καρροτενοειδών καθορίζουν αποφασιστικά την αποτελεσματικότητα της καταστολής του μονομοριακού οξυγόνου και άλλων ηλεκτρονικά διεγερμένων καταστάσεων.



Εικόνα 2: (R,R,R)- α -Τοκοφερόλη.

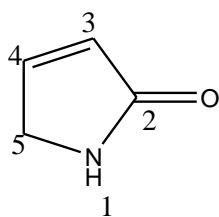
Ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Όλα τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν ισχυρά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι οι δισμουτάση του υπεροξειδίου, οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH). Ακόμη, υπάρχουν πολλά εξειδικευμένα

αντιοξειδωτικά ένζυμα που αντιδρούν και, γενικά, αποτοξινώνουν οξειδωτικές ενώσεις. Έμμεσες αντιοξειδωτικές λειτουργίες των ενζύμων είναι: (α) η λειτουργία υποστήριξης, π.χ. η αναπλήρωση της GSH από γλουταθειονικά δισουλφίδια (GSSG) από την φλαβοπρωτεΐνη GSSG αναγωγάση και (β) η μεταφορά και εξάλειψη αντιδραστικών ενώσεων, π.χ. οι S- τρανσφεράσες και τα συστήματα των S- συμπλόκων της γλυταθειόνης. Διαφορετικές υποκυτταρικές περιοχές και διαφορετικοί τύποι κυττάρων μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων. (Helmut, 1997)

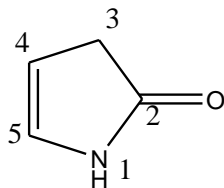
1.3 Πυρρολινόνες

Οι πυρρολινόνες είναι οργανικές ετεροκυκλικές ενώσεις με μοριακό τύπο C_4H_5NO . Είναι κυκλικές αμίνες ή αμίδια, ανάλογα με την θέση της κετονο-ομάδας, με ένα διπλό δεσμό. Οι Πυρρολιν-2-όνες είναι κυκλικά αμίδια αλλά οι Πυρρολιν-3-όνες είναι κυκλικές εναμίνες, με μία κετονο-ομάδα στην 3- θέση. Το Σχήμα 1 δείχνει κάποια παραδείγματα πυρρολινονών με τις ονομασίες τους. Η αρίθμησή τους ξεκινάει από το άζωτο και συνεχίζει όπως φαίνεται. Π.χ. η 1,5-δίδρο-2H-πυρρολ-2-όνη λέγεται και 3-πυρρολιν-2-όνη.

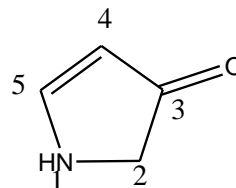
Οι Πυρρολινόνες δύναται να υποκατασταθούν σε κάθε θέση εκτός της θέσης της κετονο-ομάδας. Οι υποκατεστημένες πυρρολινόνες συνήθως συνθέτονται απευθείας από τα πρόδρομά τους μόρια και όχι μέσω αντίδρασης της μη-υποκατεστημένης πυρρολινόνης με ένα ηλεκτρόφιλο ή πυρηνόφιλο αντιδραστήριο. (Boiadjiev S.E. et al, 2005)



1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one



1,3-dihydro-2H-pyrrol-2-one

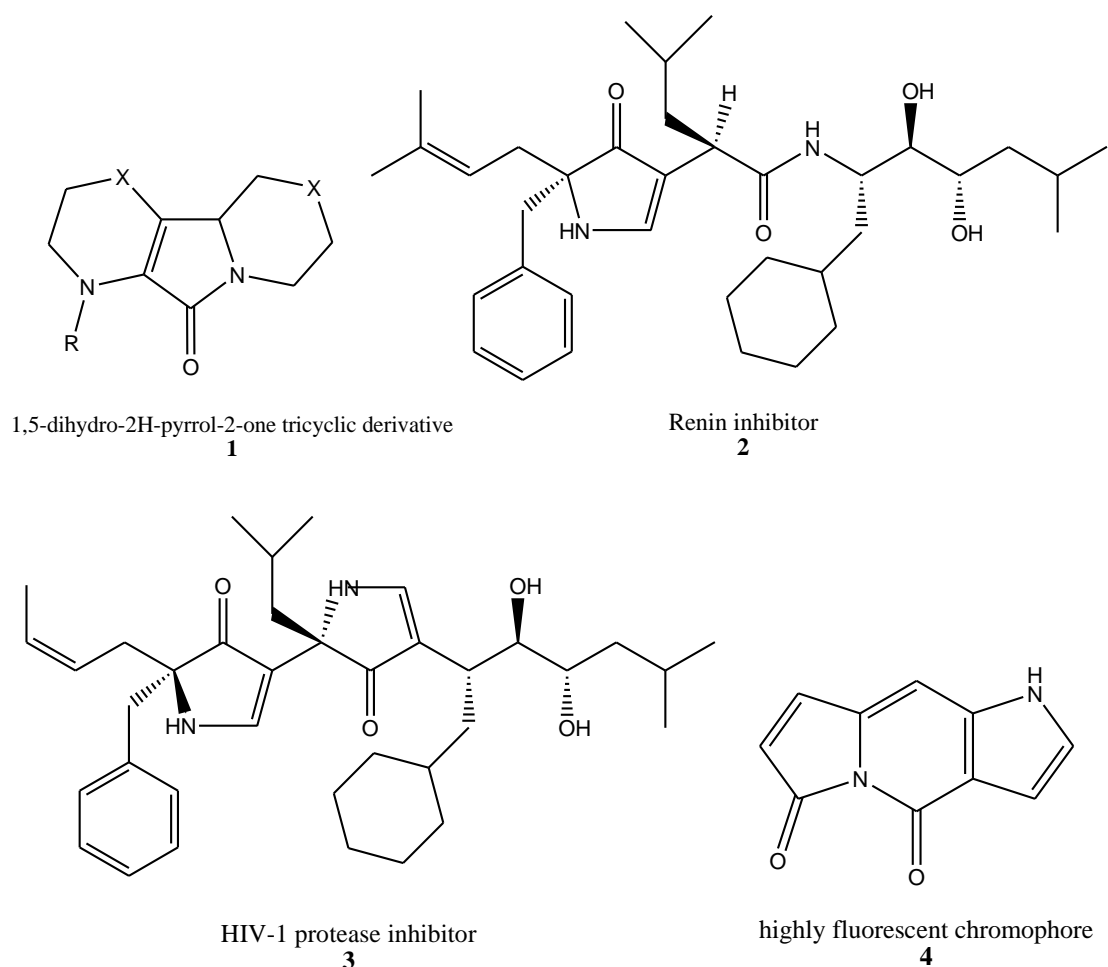


1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one

Σχήμα 1: Δομή πυρρολινονών με αριθμηση κατά IUPAC.

1.3.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολινονικό δακτύλιο και εφαρμογές τους στην φαρμακολογία.

Οι Πυρρολινόνες έχουν πολλές εφαρμογές. Οι ενώσεις της ομάδας τρικυκλικών παραγώγων της 1,5-Διυδρο-2H-πυρρολ-2-όνη **1** είναι παραδείγματα υποκατεστημένων πυρρολινονών με φαρμακολογική δράση, συγκεκριμένα αντιμολυσματική, αντιβακτηριδιακή ή/και αντι-μυκητιακή δράση. Σε αυτήν την ομάδα μορίων, το X μπορεί να αντιπροσωπεύει S, SO, SO₂, O και R, επιλεγμένο από ένα γκρουπ αποτελούμενο από C₁-C₅ αλκύλια, C₃-C₅ αλκένυλα, μη-υποκατεστημένα C₃-C₇ κυκλοαλκένυλα και 4-φαίνυλβένζυλ. Οι Πυρρολινόνες είναι γνωστές και ως αναστολείς της ρενίνης όπως το μόριο **2**. Ένας αναστολέας ρενίνης χρησιμοποιείται κυρίως στην θεραπεία της υπέρτασης. Το μόριο **3** έχει παρόμοια δομή, αλλά διαφορετική εφαρμογή. Αυτό το μόριο φέρει έναν πυρρολινονικό δακτύλιο παραπάνω από ότι το μόριο **2** και δρα ως αναστολέας της HIV-1 προτεάσης. (Guzman et al, 1996) Ένα άλλο παράδειγμα με διαφορετική εφαρμογή είναι ένα πολύ φθορίζον πύρρολο[3,2-f]ινδολιζινο-4,6-δίοιο χρωμοφόρο **4** το οποίο ενδέχεται να είναι χρήσιμο στην φθορίζουσα απεικόνιση του μεταβολισμού του ήπατος. (Boiadjev S.E. et al, 2005)



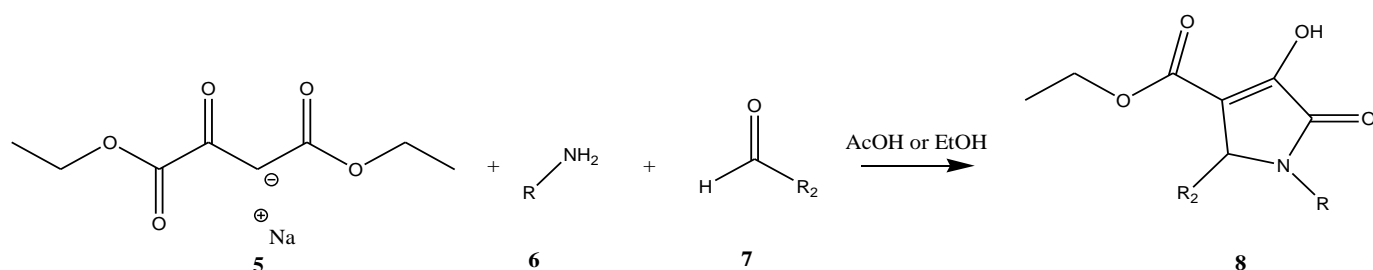
Σχήμα 2: Πυρρολινόνες με φαρμακευτικές εφαρμογές.

1.3.2 Σύνθεση των πυρρολινονών

Οι διάφορες μελέτες με θέμα τις πυρρολινόνες έχουν καταλήξει σε διαφορετικές στρατηγικές σύνθεσης. Ενώ υπάρχουν ήδη πολλές γνωστές δομές πυρρολινονών, οι τρόποι σύνθεσης των ενώσεων αυτών ακόμη ερευνάται. Προφανώς, η μέθοδος σύνθεσής τους διαφοροποιείται ανάλογα με τη δομή της ένωσης. Για παράδειγμα, οι 2-πυρρολινόνες συνθέτονται με διαφορετικό τρόπο από ότι οι 3-πυρρολινόνες.

Η κύρια μέθοδος σύνθεσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι μία αντίδραση τριών συστατικών, ξεκινώντας από διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου, αμμωνία ή πρωτοταγή αμίνη και αλδεΐδη. Στην αντίδραση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί οξύ ως καταλύτης ή να θερμανθούν τα συστατικά χρησιμοποιώντας

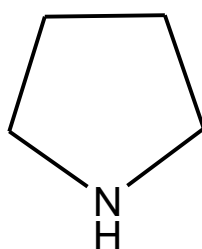
αιθανόλη ως διαλύτη. Αρχικά η αμίνη και η αλδεΐδη σχηματίζουν μία ιμίνη. Κατόπιν, με αντίδραση Mannich, η ιμίνη και το διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου σχηματίζουν δακτύλιο. Μετά από ισομερισμό, σχηματίστηκε πυρρολινόνη με υποκαταστάτες στην 1-και/ή 2-θέση (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Αντίδραση τριών συστατικών με κυκλοποίηση Mannich.

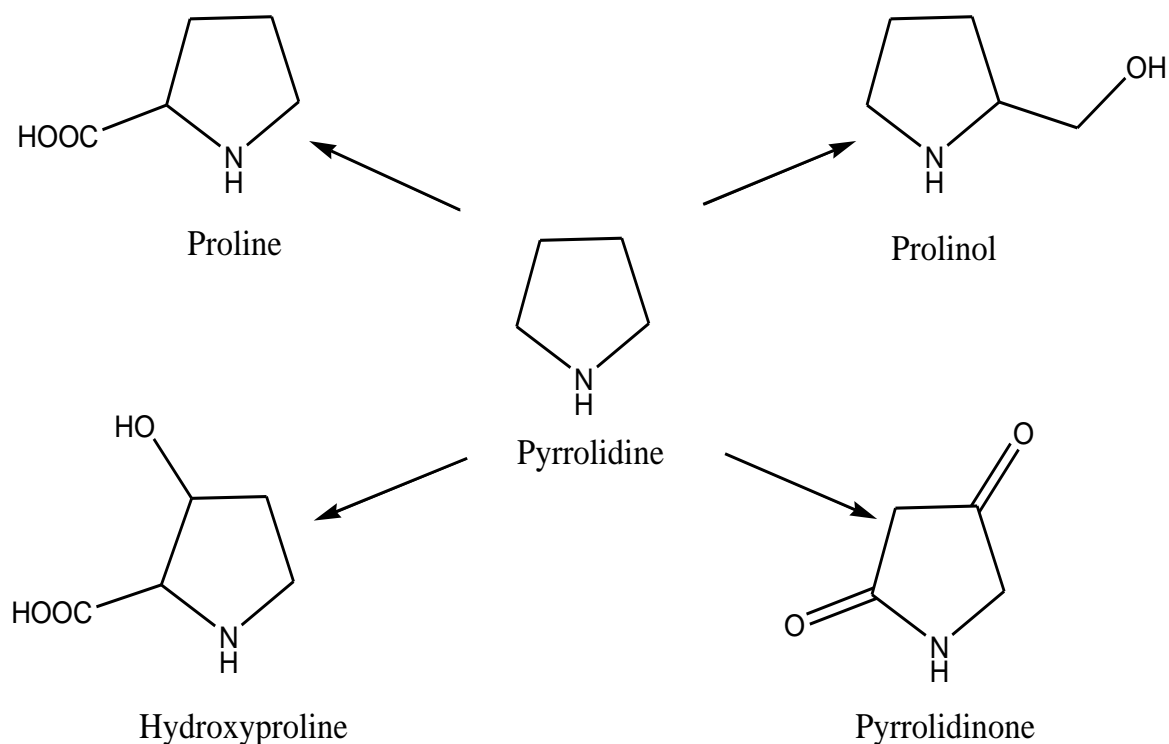
1.4 Πυρρολιδίνες

Σημαντικός αριθμός ενώσεων στη βιβλιογραφία, συνθετικών και μη, αναφέρουν την πυρρολιδίνη ως βασικό δομικό συστατικό. Πρόκειται για δευτεροταγή κυκλική αμίνη, που συνιστάται από ετεροκυκλικό δακτύλιο με τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου (Εικόνα 3). Η ύπαρξη του ατόμου αζώτου προσδίδει στον πυρρολιδινικό δακτύλιο βασικό χαρακτήρα.



Εικόνα 3: Πυρρολιδινικός δακτύλιος

Ο πυρρολιδινικός δακτύλιος αποτελεί δομικό στοιχείο των αμινοξέων προλίνη και υδροξυπρολίνη, στα οποία ο πενταμελής δακτύλιος έχει υποκατασταθεί με τις λειτουργικές ομάδες του υδροξυλίου και του καρβοξυλίου. Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ενώσεις πυρρολιδίνης, άλλες με υποκατεστημένη πλευρική αλειφατική αλυσίδα και άλλες με καρβονύλιο επί του δακτυλίου (Εικόνα 4). Παρακάτω απεικονίζονται η υδροξυπρολίνη, η πυρρολιδινόνη, η προλινόλη και η προλίνη.



Εικόνα 4: Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο

Πολλές ενώσεις με σημαντική βιολογική δράση που απαντώνται στη φύση φέρουν τον βασικό δακτύλιο της πυρρολιδίνης. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν οι vindesine, piracetam, clausenamide και atorvastatin, για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντιμυτωτικές, αντιβακτηριακές και άλλες ιδιότητες. Οι

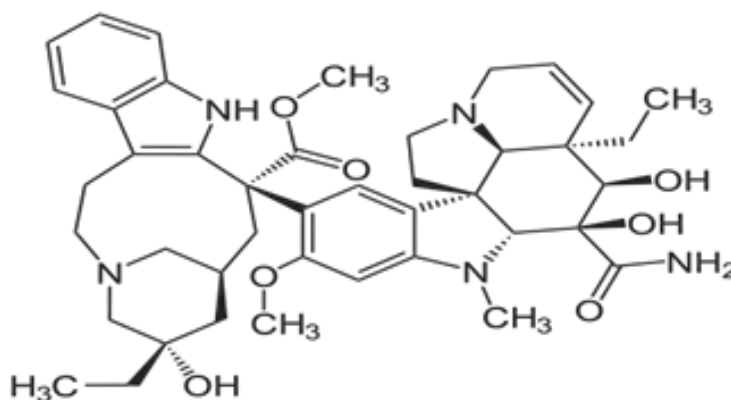
ίδιες πάλι ενώσεις, αποτελούν ενδιάμεσα για τη σύνθεση πιο περίπλοκων και σημαντικών φαρμακευτικά ενώσεων όπως οι detoxine, lactacystin και πολλών άλλων (Yaakob, 2009).

1.4.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο και βιολογική δράση

Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη παράγραφο αρκετές ενώσεις με σημαντική φαρμακολογική δράση εμπεριέχουν τον πυρρολιδινικό δακτύλιο και χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενειών. Παρακάτω αναφέρονται παραδείγματα αυτών και η εφαρμογή τους στη θεραπευτική (Yaakob, 2009).

Vindesine

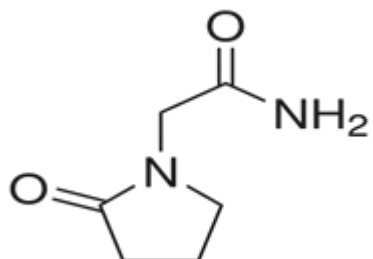
Λειτουργεί ως αναστολέας της μίτωσης και χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου όπως είναι η λευχαιμία, το λέμφωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα.



Εικόνα 5: Μοριακή δομή του Vindesine

Piracetam

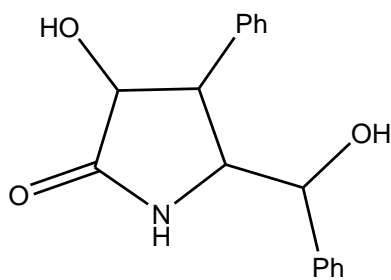
Εμφανίζει ιδιότητες ενίσχυσης της νόησης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως το Alzheimer.



Εικόνα 6: Μοριακή δομή του Piracetam

Clausenamide

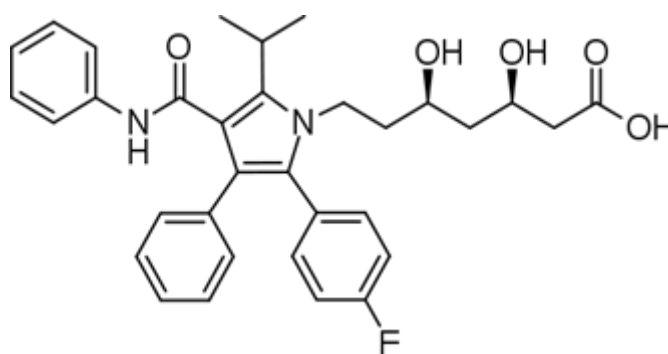
Παράγοντας προστασίας του ήπατος που χρησιμοποιείται συνήθως στην θεραπεία κατά της οξείας και χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας.



Εικόνα 7 : Μοριακή δομή του Clausenamide

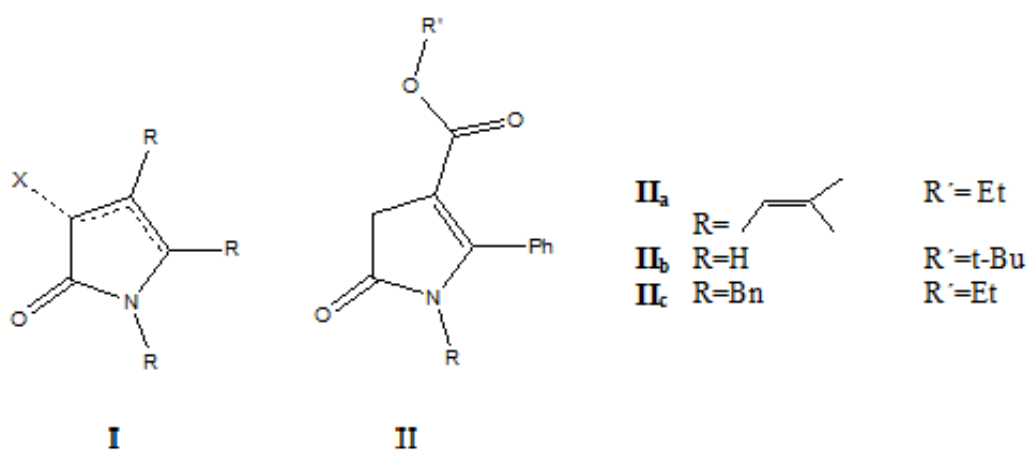
Atorvastatin

Χρησιμοποιείται για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης εμποδίζοντας τη de novo σύνθεση χοληστερόλης στον οργανισμό.



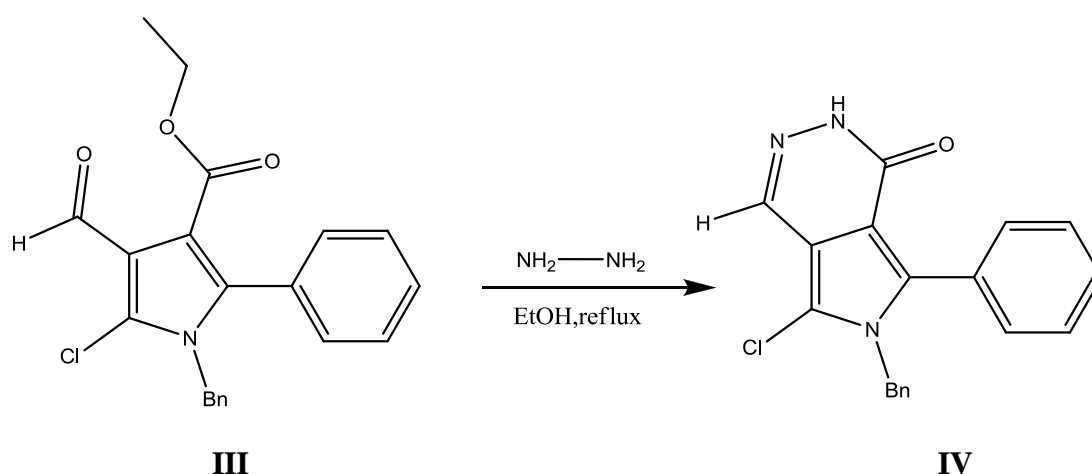
Εικόνα 8: Μοριακή δομή του Atorvastatin

Εκτός των παραπάνω φυσικών παραγώγων, άλλα ανάλογα που φέρουν στη δομή τους τον πυρρολιδινικό δακτύλιο, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο για τη σύνθεση νέων θεραπευτικών ενώσεων όσο και για την αξιολογή αντική και αντικαρκινική τους δράση. Συγκεκριμένα, οι 2-οξοπυρρόλες **I** (Εικόνα 9) χρησιμοποιούνται ευρέως και αποτελούν τη βασική δομή σε πολλά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων που έχουν ενεργή δράση ενάντια σε ιικές μολυσματικές ασθένειες (HIV, γρίπη), αντικαρκινικούς παράγοντες και προϊόντα που δρουν ενάντια σε ασθένειες μικροβιολογικής φύσεως (είτε βακτηριακής, είτε μυκητιακής). Επιπλέον, οι 2-οξοπυρρόλες είναι γνωστές ως θεμέλιοι λίθοι για τη σύνθεση των αλκαλοειδών, καθώς και προϊόντων όπως οι 2,2'-διπυρρόλες, οι τετραπυρρόλες και κάποιες χρωστικές. Πέρα από τις πολύ γνωστές 5-αλκυλο-2-οξοπυρρόλες, που πρωτοαναφέρθηκαν το 1890 από τον Emery, στην βιβλιογραφία έχει γίνει ελάχιστη αναφορά στα 5-αρυλο-2-πυρρολο παράγωγα **II** (Εικόνα 9). Οι 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δικετοπυρρολοπυρρολών ως πιθανοί μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs), με φθορίζουσα ικανότητα (Dehaen et al., 2006).



Εικόνα 9: 2-οξοπυρρόλες **I** και 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες **II**

Στο σημείο αυτό είναι άξιο λόγου να αναφερθεί η δημιουργία παραγώγων του 2-οξοπυρρολίου με αλδεΐδες, διαζωνιακά άλατα, ενεργούς εστέρες και διθειάνθρακα με στόχο τη σύνθεση νέων ενώσεων. Επίσης, η χλωροφορμυλίωση του **IIc** παρείχε τις πυρρολο-καρβαλδεΐδες **III** (Σχήμα 5). Ένας μεγάλος αριθμός πυρρολο-καρβαλδεΐδων χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση πολυκυκλικών ενώσεων. Για παράδειγμα, οι πυρρολο [3,4-d] πυριδαζιόνες **IV** απομονώθηκαν με σύντηξη αλδεϋδικού και εστερικού δακτυλίου του **III** μέσω υδραζίνης (Σχήμα 5).



Σχήμα 4: Παράδειγμα σύνθεσης ετεροκυκλικής ένωσης **IV** από πυρρολο-καρβαλδεΐδη **III**

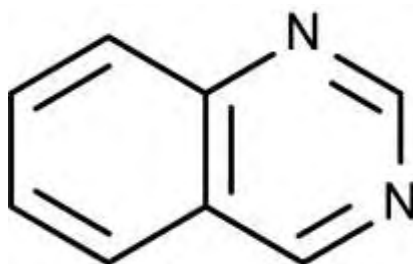
Συνεπώς, αποδείχθη ότι οι οξοπυρρόλες και τα ανάλογά τους αποτελούν ενδιαφέροντες και πολύπλευρους δομικούς λίθους στη Συνθετική Οργανική Χημεία. Επίσης πολλές από αυτές τις ενώσεις αποδείχθηκαν νέα ενδιάμεσα στη σύνθεση πολυυποκατεστημένων πυρρολίων (Dehaen et al., 2006).

1.5 Κιναζολινικά και κινोξαλινικά παράγωγα

1.5.1 Γενικά

Η κιναζολίνη είναι μία ετεροκυκλική ένωση συνιστώμενη από δύο συνενωμένους εξανικούς απλούς αρωματικούς δακτυλίους, ένας βενζολικό δακτύλιο και έναν πυριμιδικό δακτύλιο. Η χημική της φόρμουλα είναι $C_8H_6N_2$, και είναι κίτρινο στερεό. Είναι ισομερές με άλλες ναφθυριδίνες συμπεριλαμβανομένων της κινοξαλίνης, της φθαλαζίνης και της κινολίνης. Τα παράγωγα της κιναζολίνης λέγονται κιναζολίνες.

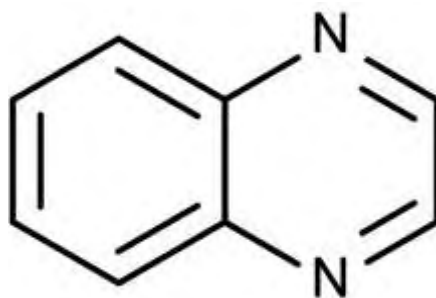
Φαρμακολογικά έχει χρησιμοποιηθεί τόσο ως παράγοντας κατά της ελονοσίας όσο και στην θεραπεία κατά του καρκίνου. Το σύστημα των δακτυλίων παραδοσιακά παρασκευάζεται με τη θέρμανση 2-ακυλανιλιδών παρουσία αμμωνίας ή αμινών. (Armarego, W.L.F., 1963)



Εικόνα 10: Δομή της κιναζολίνης

Η κινοξαλίνη, ή αλλιώς βενζοπυραζίνη, είναι μία ετεροκυκλική ένωση της οποίας το σύμπλεγμα δακτυλίων αποτελείται από έναν βενζολικό δακτύλιο και έναν πυραζινικό δακτύλιο. Είναι ισομερές με άλλες ναφθυριδίνες συμπεριλαμβανομένων της κιναζολίνης, της φθαλαζίνης και της κινολίνης.

Οι κινοξαλίνες χρησιμοποιούνται ως βαφές, φαρμακευτικά και αντιβιοτικά. Κάποιες μελέτες διεξήχθησαν με σκοπό τη διερεύνηση των ογκοκατασταλτικών ιδιοτήτων των κινοξαλινικών ενώσεων. (Jean Renault, 1981) Πρόσφατα, η κινοξαλίνη και τα ανάλογά της έχουν διερευνηθεί ως σύνδεσμοι των καταλυτών. (Xianghong Wu, Anne E. V. Gorden, 2007)



Εικόνα 11: Δομή της κινोξαλίνης

1.5.2 Τα κιναζολινικά και κινοξαλινικά παράγωγα ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

Το DNA αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς στόχους πολλών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Πολυκυκλικές αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις με επίπεδη δομή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα δεδομένου ότι παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Ευρέως γνωστοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, όπως οι ανθρακυκλίνες, το camptothecin και το amsacrine, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από επίπεδες πολυκυκλικές δομές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα ένζυμα τοποϊσομεράση I και II σχηματίζοντας ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο μεταξύ του φαρμάκου, του DNA και του ενζύμου.

Στην προσπάθεια εύρεσης διάφορων χημικών ενώσεων με στόχο το σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, αποδείχθηκε ότι τα κιναζολινικά και κινοξαλινικά παράγωγα αποτελούν μία νέα τάξη χημειοθεραπευτικών αναλόγων, ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι των καρκινικών όγκων.

Οι κινοξαλίνες και οι δομικά συγγενείς κινοξαλινόνες αντιπροσωπεύουν μία σημαντική τάξη ενώσεων που βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό βιολογικά και φαρμακολογικά χρήσιμων παραγόντων. Ένα μεγάλο μέρος των συνθετικών κινοξαλινών παρουσίασε αντινεοπλαστική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, οι υποκατεστημένες (φαινοξυμεθυλ) κινοξαλινόνες επέδειξαν άριστη ανταγωνιστικότητα έναντι της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης και της πρωτεΐνης (MRP1)α σε

σειρές κυττάρων με αντίσταση σε φάρμακα. Ο κινολινικός δακτύλιος οδήγησε σε βενζο[f]πυριδο[4,3-b] και πυριδο[3,4-β] κινολινικά παράγωγα τα οποία επέδειξαν αναστολή των τοποϊσομερασών. (Diana P. Et al, 2008)

Τα κινολινικά παράγωγα είναι γνωστοί ισχυροί αναστολείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας είναι μία διαμεμβρανική κινάση της τυροσίνης και υπερεκφράζεται σε πολλές περιπτώσεις καρκινικών όγκων (π.χ. του στήθους, των ωοθηκών, του προστάτη και του κόλον). Συνεπώς, ως αναστολείς του EGFR, τα κινολινικά παράγωγα αναμένεται να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες έναντι κακοηθών επιθηλιακών νοσημάτων. (Noolvi et al, 2011)

1.5.3 Μοριακά στοχευμένη θεραπεία με τη χρήση κινολινικών και κινολινικών παραγώγων

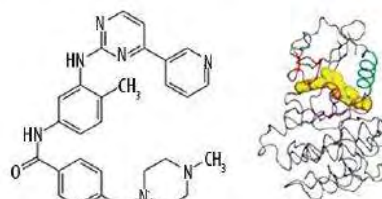
Ενώ μερικοί τύποι καρκίνου είναι ευαίσθητοι στην εφαρμογή αντι-καρκινικών θεραπειών όπως η σύνθεση του DNA, παράγοντες που αλλοιώνουν το DNA και συγκεκριμένοι παρεμποδιστές κυτταρικών υποδοχέων, πολλοί άλλοι τύποι καρκίνου παρουσιάζουν υψηλή αντοχή και έχουν αποδειχτεί πολύ δύσκολοι στην θεραπεία τους. Η θεραπεία αυτών των όγκων είναι δύσκολη, και το πεδίο αυτό χρειάζεται επειγόντως νέες θεραπευτικές στρατηγικές. Για παράδειγμα, η χρόνια μυελοειδής λευχαιμία (CML), είναι ένας από τους πολλούς τύπους όγκων οι οποίοι έχουν αποδειχθεί ανεχτικοί στη θεραπεία έως την πρόσφατη αναγνώριση ενός συγκεκριμένου μικρο-μοριακού φαρμάκου. Η CML αναπτύσσεται μέσω μιας σειράς διακριτών σταδίων, κατά τα οποία οι γενετικές μετατροπές σταδιακά συσσωρεύονται. Σε περισσότερες από το 95% των περιπτώσεων CML υπάρχει αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 η οποία δημιουργεί το BCR-ABL ογκογονίδιο. Η BCR-ABL συντηγμένη πρωτεΐνη συνθέτεται κατά την έκφραση με αποτέλεσμα η δραστηριότητα της κινάσης της τυροσίνης του κωδικοποιημένου ABL να είναι πολύ υψηλή στα CML κύτταρα και να οδηγεί σε καρκινικούς φαινοτύπους. Για το λόγο αυτό, η αναστολή της καταλυτικής

δραστικότητας του ABL έχει προβλεφθεί ως μία αποτελεσματική στρατηγική για τη θεραπεία της CML. Οι πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και οι φαρμακευτικές εταιρείες έχουν αναπτύξει ειδικούς αναστολείς για αρκετές κινάσες, ώστε να ελέγξουν τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες.

Μία αξιοσημείωτη περίπτωση είναι αυτή του μικρομοριακού αναστολέα (PDGF-R) που ονομάζεται Imatinib mesylate και έδειξε αποτελεσματική ανασταλτική δράση στην δραστηριότητα της κινάσης των ABL πρωτεϊνών. Αυτό το φάρμακο σήμερα χρησιμοποιείται αποτελεσματικά στην θεραπεία ασθενών με CML. Όμως, με το χρόνο, οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε το φάρμακο ανέπτυξαν αυξανόμενη αντίσταση, προφανώς λόγω ανάπτυξης δευτερογενών μεταλλάξεων στην EGFR. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αντίστασης, χρησιμοποιούνται ακόμα δύο μικρά μόρια (το dasatinib και το nilotinib) που αλληλεπιδρούν με την EGFR με κάπως διαφορετικό τρόπο, και προς το παρόν έχουν επιτυχώς εμποδίσει την ανάπτυξη όγκων σε ασθενείς με υποτροπιασμένους όγκους μετά την θεραπεία με το imatinib (Εικόνα 12).

A

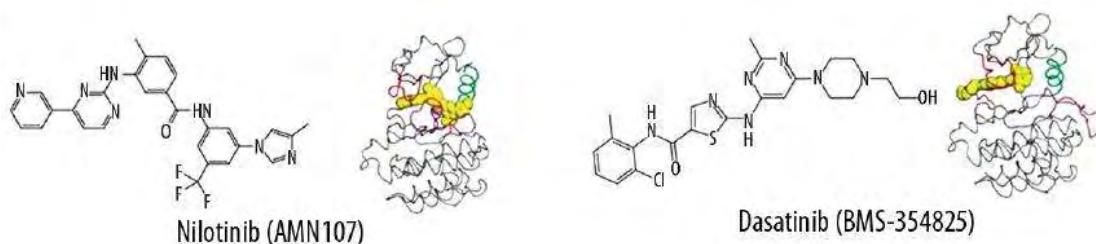
The first-generation ABL TK inhibitor



Imatinib (STI571)

B

The second-generation ABL TK inhibitors



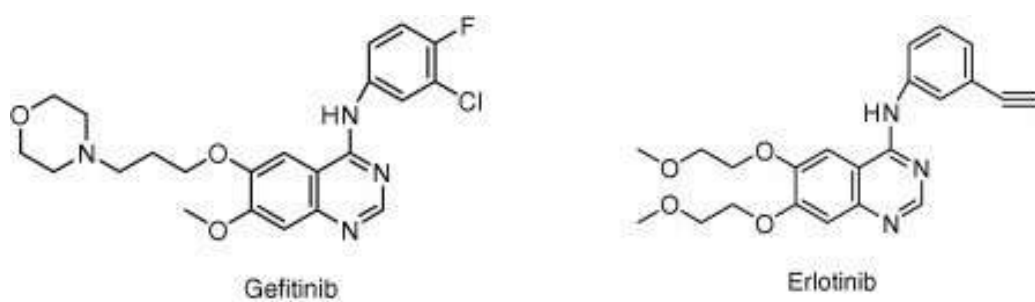
Nilotinib (AMN107)

Dasatinib (BMS-354825)

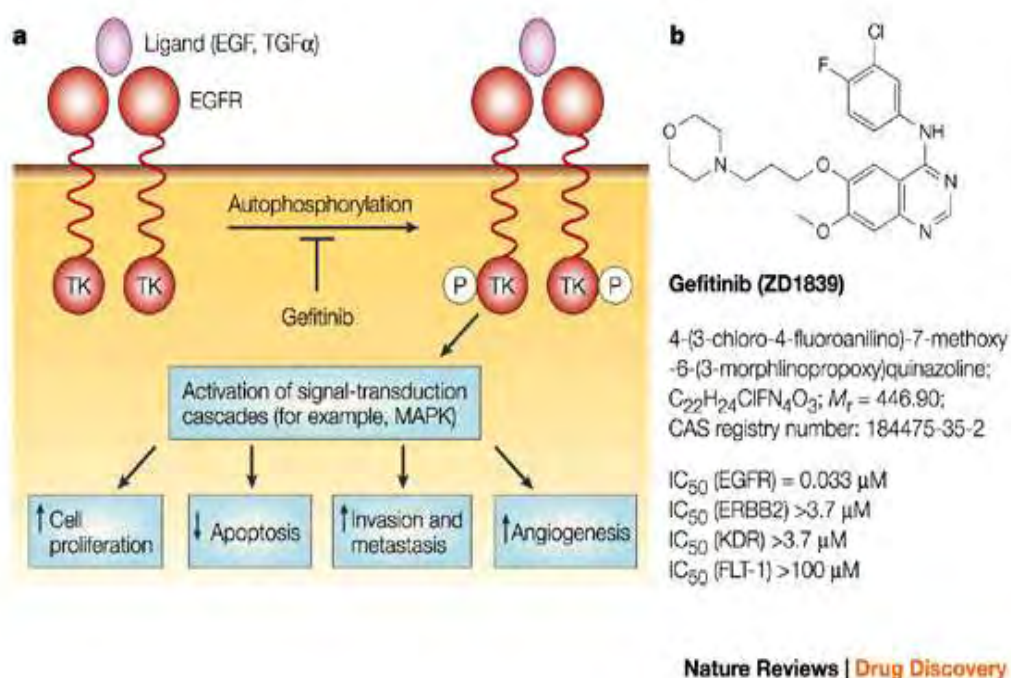
Εικόνα 12: Ο μικρομοριακός αναστολέας πρώτης γενιάς Imatinib mesylate και οι μικρομοριακοί αναστολείς δεύτερης γενιάς dasatanib και nolotinib.

Υπό την ίδια αρχή στόχευσης της δραστηριότητας της κινάσης, η αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης της τυροσίνης της EGFR από ακόμη ένα μικρομοριακό φάρμακο, το Gefitinib, έχει επιτύχει στην θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων (NSCLC) (Εικόνα 14). Το Gefitinib είναι ο πρώτος επιλεκτικός αναστολέας της περιοχής της κινάσης της τυροσίνης της EGFR. Η πρωτεΐνη στόχος EGFR αναφέρεται μερικές φορές και ως Her1 ή ErbB-1. Η EGFR υπερεκφράζεται στα κύτταρα συγκεκριμένων τύπων ανθρώπινων καρκινωμάτων, όπως για παράδειγμα, στον NSCLC και στους καρκίνους των πνευμόνων. Ο NSCLC είναι πολύ ανεχτικός και μεταστατικός καρκίνος. Αυτό οδηγεί σε ανάρμοστη ενεργοποίηση του αντι-αποπτωτικού αλυσίδας μετάδοσης σήματος RAS, καταλήγοντας σε μη-ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Έρευνα σε ευαίσθητους στο Gefitinib ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων

έδειξε ότι η μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης της τυροσίνης της EGFR ευθύνεται για την ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών μονοπατιών. Αυτές οι μεταλλάξεις τείνουν να προσδίδουν αυξημένη ευαισθησία στους αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης όπως είναι το Gefitinib και το Erlotinib (Εικόνα 13). (R. Paulmurugan, 2012)



Εικόνα 13: Οι αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης Gefitinib και Erlotinib.



Εικόνα 14: a : Απλοποιημένο παράδειγμα της μετάδοσης σήματος μέσω του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα υποδοχέα (EGFR). Με την πρόσδεση στον υποδοχέα αυτός διμερίζεται. Αυτό οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, η οποία αναστέλλεται από το Gefitinib. **b** : Δομή του Gefitinib και η in vitro ανασταλτική του δραστηριότητα εναντίων διαφόρων κινάσεων της τυροσίνης. Το Gefitinib αρχικά αναγνωρίστηκε από μελέτες δομής-δραστηριότητας βασισμένες σε μία αρχική σειρά 4-ανιλिनοκιναζολινο (4-anilinoquinazoline). MAPK, μιτογενώς ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση, TGF, αυξητικός παράγοντας, TK, περιοχή κινάσης της τυροσίνης. (R. Paulmurugan, 2012)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων τα οποία περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο πυρρολο ή κινολιζιδικό παράγωγο.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι:

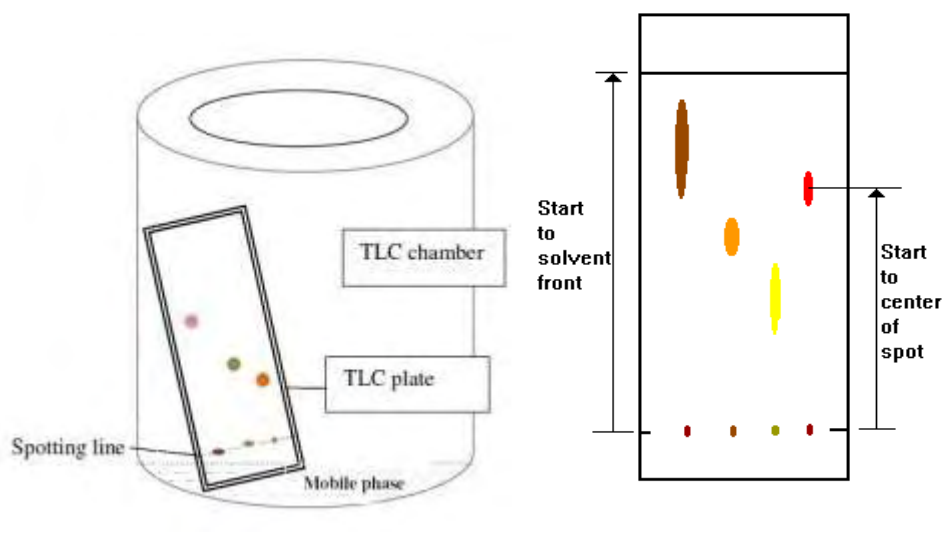
- Η σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (όπου αλογόνο φθόριο και ιώδιο, σχηματισμός δύο ενώσεων) μέσω μιας αντίδρασης ενός σταδίου με θέρμανση με επαναρροή και διαλύτη αιθανόλη, η οποία διακόπτεται με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (37%).
- Η σύζευξη των παραπάνω ενώσεων με ο-φαινυλο διαμίνη με θέρμανση με επαναρροή και διαλύτη οξικό οξύ.
- Η ταυτοποίηση των προϊόντων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR.
- Η αποτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι μιας σειράς καρκινικών κυτταρικών σειρών
- Η αποτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της διάδοσης των ελευθέρων ριζών και της εμφάνισης οξειδωτικού στρες.

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου επίπεδη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseleil 60F24) πάχους 0,2 mm.

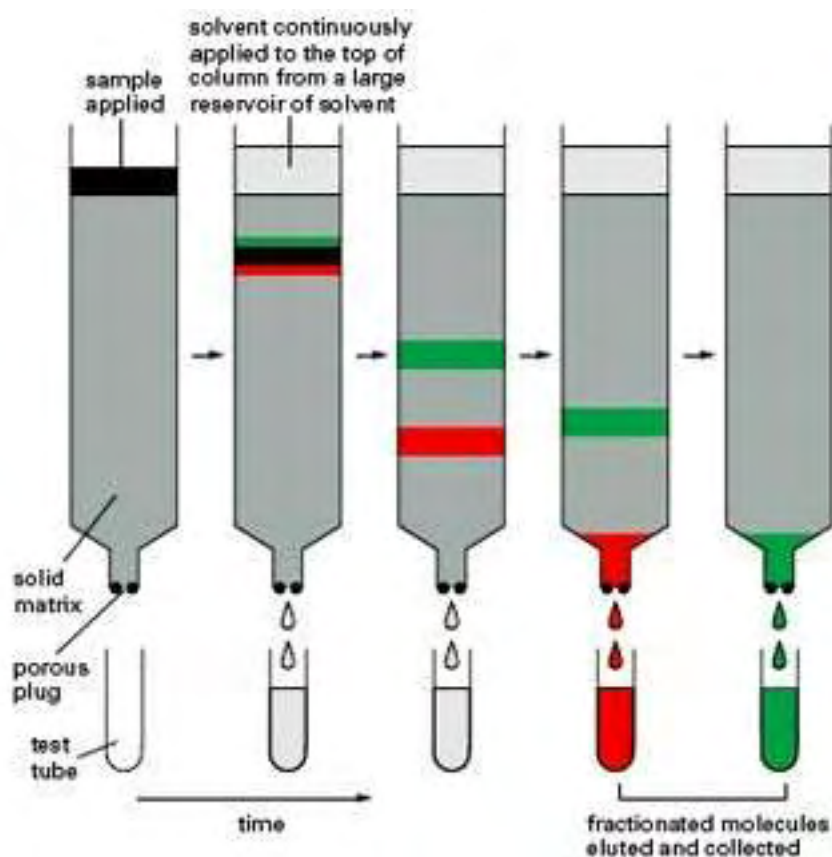
Αυτή η λεπτή στρώση απορροφητικού αποτελεί την σταθερή (ακίνητη) φάση της τεχνικής αυτής. Χρησιμοποιώντας μολύβι (γιατί η μελάνη θα προχωρήσει με την κινητή φάση με την πρόοδο της τεχνικής) γράφεται γραμμή απόστασης περίπου 2cm από την αρχή της πλάκας, πάνω στην οποία τοποθετείται το υπό εξέταση δείγμα με τη μορφή κηλίδας. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια σε αεροστεγή θάλαμο κορεσμένο με ατμούς διαλύτη, έτσι ώστε η στάθμη του διαλύτη να μην καλύπτει τις κηλίδες του δείγματος (γιατί υπάρχει κίνδυνος διάλυσής τους) (Εικόνα 15α). Ο διαλύτης αποτελεί την κινητή φάση της τεχνικής και συνήθως χρησιμοποιείται σύστημα μίγματος δύο διαλυτών. Κατόπιν, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια του τριχοειδούς φαινομένου μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας, η οποία αποσύρεται από τον θάλαμο και στεγνώνεται σε ρεύμα αέρα. Επειδή διαφορετικές ουσίες ανεβαίνουν στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους, το δείγμα διαχωρίζεται και οι ουσίες εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων κατά μήκος της πλάκας. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε ένωσης στη στατική φάση, πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης, R_f , ο οποίος ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση / απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη (Εικόνα 15β). Η τιμή R_f μιας άγνωστης ένωσης χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της. Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H_2SO_4 (θειικού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm). Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :



Εικόνα 15: α) Τρόπος τοποθέτησης πλάκας TLC σε αεροστεγή θάλαμο. β) Προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης, R_f .

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται μετά την απομόνωση μιας χημικής ένωσης με σκοπό τον καθαρισμό της από παραπροϊόντα. Το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε σύστημα οργανικών διαλυτών συγκεκριμένης κάθε φορά αναλογίας και αφήνεται να διαρρέψει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα που εμπεριέχει προσροφητικό υλικό. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα. Η διαδικασία επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).



Εικόνα 16: Χρωματογραφία στήλης

3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων

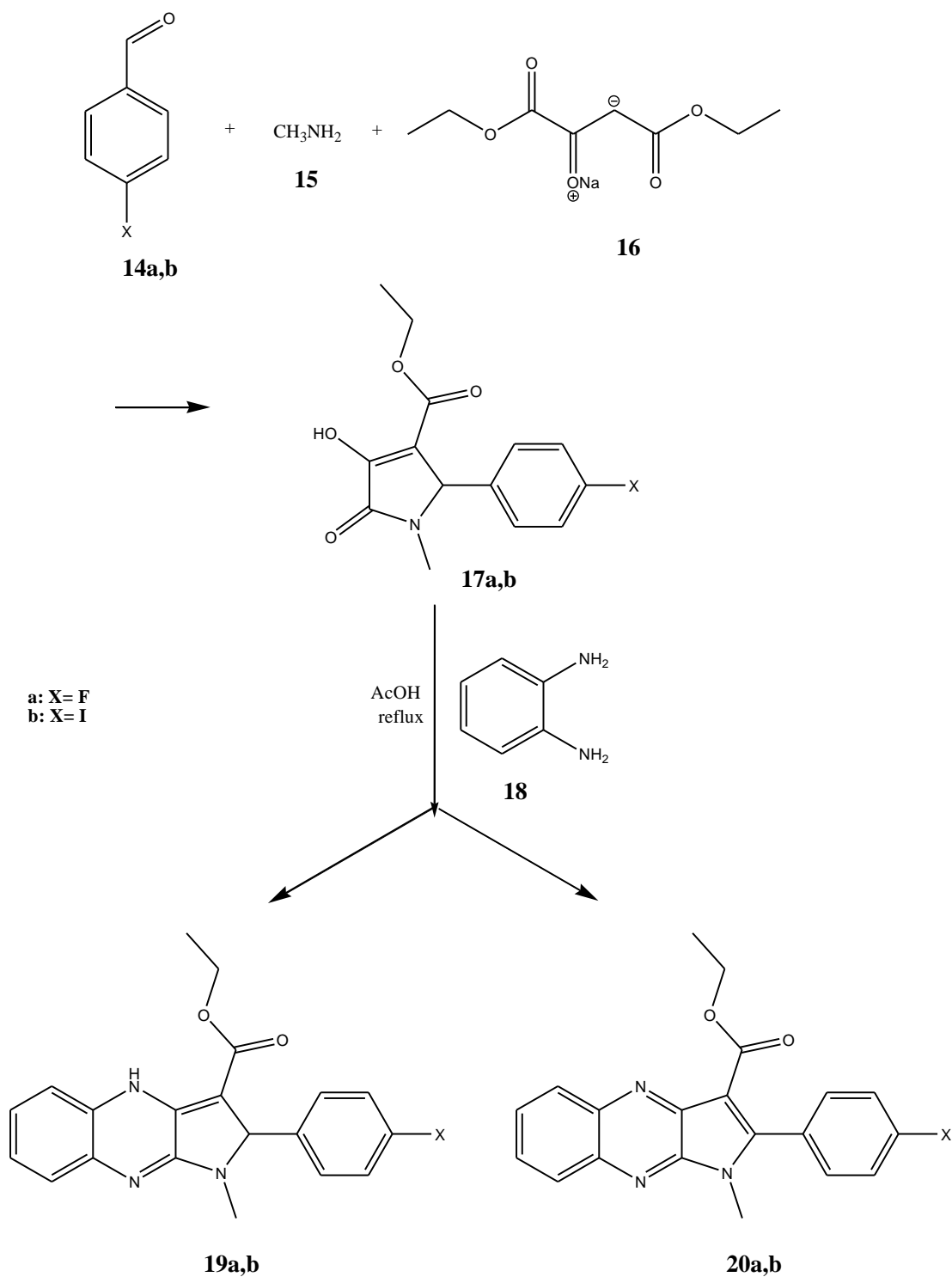
Ο Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι, όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπιν. Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης

χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών. Τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνικής μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και δυναμικής ενώσεων σε στερεά κατάσταση.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCE^{III} 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), t (triple), q (quadruple), m (multiple). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

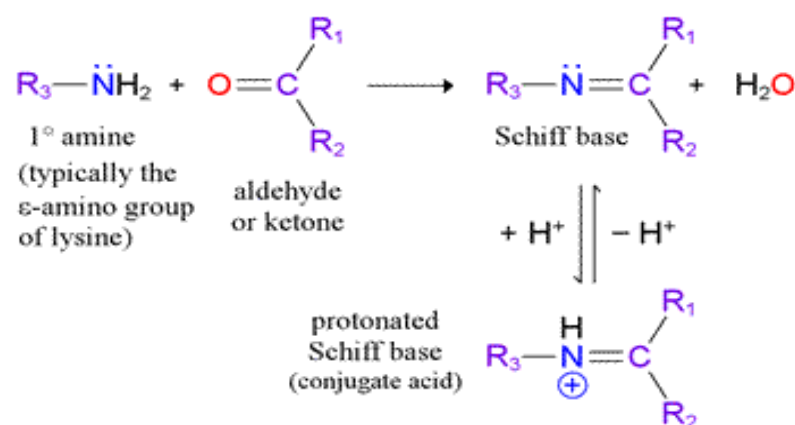
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού



Τα προϊόντα **17a,b** σχηματίστηκαν μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης προσθήκης. Πυρηνόφιλο είναι ένα άτομο ή μόριο που περιέχει ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων, το οποίο μπορεί να προσφέρει προς σχηματισμό δεσμού σε χημική αντίδραση. Το πυρηνόφιλο είναι αρνητικά φορτισμένο και αναζητά ένα θετικά φορτισμένο κέντρο για να προσφέρει το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων που διαθέτει. Συνεπώς η πυρηνόφιλη προσθήκη είναι μια αντίδραση προσβολής ενός ηλεκτρονιόφιλου από ένα πυρηνόφιλο.

Τα πυρηνόφιλα του αζώτου όπως είναι η αμμωνία και τα παράγωγά της $\text{H}_2\text{N-Z}$ προστίθενται στην ομάδα του καρβονυλίου των αλδεϋδών και των κετονών. Η αντίδραση καταλύεται από οξύ. Η ισορροπία της αντίδρασης ευνοεί το σχηματισμό του προϊόντος εξαιτίας της ταχείας αφυδάτωσης του ενδιάμεσου τετραεδρικού προϊόντος προσθήκης. Το αποτέλεσμα είναι η αντικατάσταση της κετονομάδας (C=O) από την ομάδα C=N-Z .

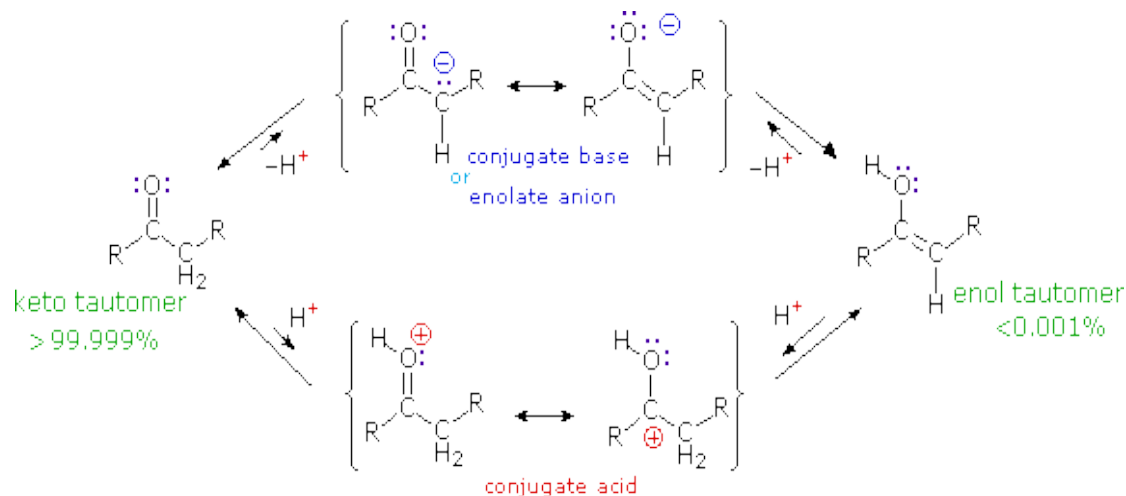
Οι αλδεΐδες και οι κετόνες αντιδρούν με πρωτοταγείς αμίνες προς σχηματισμό βάσεων του Schiff. Αυτές οι ενώσεις λέγονται επίσης και ιμίνες (Εικόνα 17). (Yaakob, 2009)



Εικόνα 17: Παράδειγμα πυρηνόφιλης προσθήκης προς σχηματισμό βάσης Schiff.

Ακόμη, στην αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης της Εικόνας 17 εμφανίζεται το φαινόμενο της κετο-ενολικής ταυτομέρειας. Μια ένωση που περιέχει καρβονύλιο ($C=O$) είναι σε ταχεία ισορροπία με ένα ενολικό ταυτομερές, το οποίο περιέχει ένα ζεύγος ατόμων άνθρακα ενωμένων με διπλό δεσμό που βρίσκονται δίπλα σε μία υδροξυλική ομάδα ($-OH$), $C=C-OH$. Στις περισσότερες κετόνες επικρατεί η κετο-μορφή. Αυτή η διαδικασία λέγεται ταυτομέρεια και καταλύεται τόσο από οξέα όσο και από βάσεις.

Γενικά, οι ενόλες είναι ασταθείς ενώσεις και βρίσκονται σε ισορροπία με μία ευνοϊκότερη καρβονυλική ομάδα. Η ενολική μορφή είναι σημαντική σε μερικές αντιδράσεις. Επιπλέον, το αποπρωτονιωμένο ενδιάμεσο στην αλληλομετατροπή των δύο μορφών, που αναφέρεται ως ενολικό ανιόν, είναι σημαντικό στη χημεία του καρβονυλίου, κυρίως επειδή αποτελεί ισχυρό πυρηνόφιλο. (Yakob, 2009)



Εικόνα 18: Παράδειγμα κετο-ενολικής ταυτομέρειας καταλυόμενης από οξύ και από βάση.

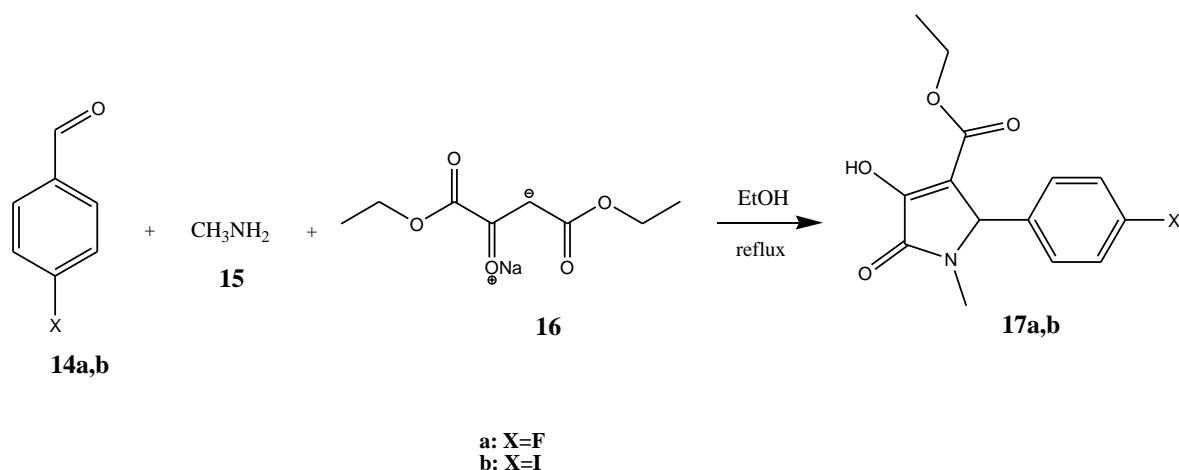
Σε αυτή την έρευνα, για τη σύνθεση των 2,3 πυρρολιδινών (πυρρολο-2-νών) μέσω μιας αντίδρασης τριών συστατικών, χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη

- Διαιθυλικό οξαλικό άλας του νατρίου
- Μεθυλαμίνη και
- 4-φθορο και 4-ιωδο βενζαλδεΐδη .

Έπειτα τα προϊόντα **17a,b** του πρώτου μέρους υπέστησαν σύζευξη με ο-φαινυλο διαμίνη απόπου προέκυψαν τέσσερα επιθυμητά προϊόντα **19a,b** (non-aromatized) και **20a,b** (aromatized).

4.1.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **17** μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων.

Αντίδραση:



Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 4-βρωμο-βενζαλδεΐδης **14** απαιτούν: 7.11 mmol μεθυλαμίνης **15**, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου **16** και 25 ml αιθανόλη.

Πειραματική διαδικασία:

Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 4-αλογονο-βενζαλδεΰδη **14** (1.42 mmol), μεθυλαμίνη **15** (59 μl, 1.42 mmol), διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου **16** (300mg, 1.42 mmol), και αιθανόλη (5.5 ml, 1.42 mmol). Στη φιάλη εφαρμόστηκε κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα θερμάνθηκε με επαναρροή για 2 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC. Μετά το πέρας των 2 ωρών προστέθηκε στην φιάλη παγωμένο απιονισμένο νερό και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι 4-5. Το επιθυμητό προϊόν καθίζανε ως ίζημα το οποίο διηθήθηκε υπό κενό και ξεπλύθηκε αρκετές φορές με παγωμένο αποσταγμένο νερό και εξάνιο ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα 4-αλογονο-βενζαλδεΰδης που δεν αντέδρασε. Το προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

Αποτελέσματα

Για X=F

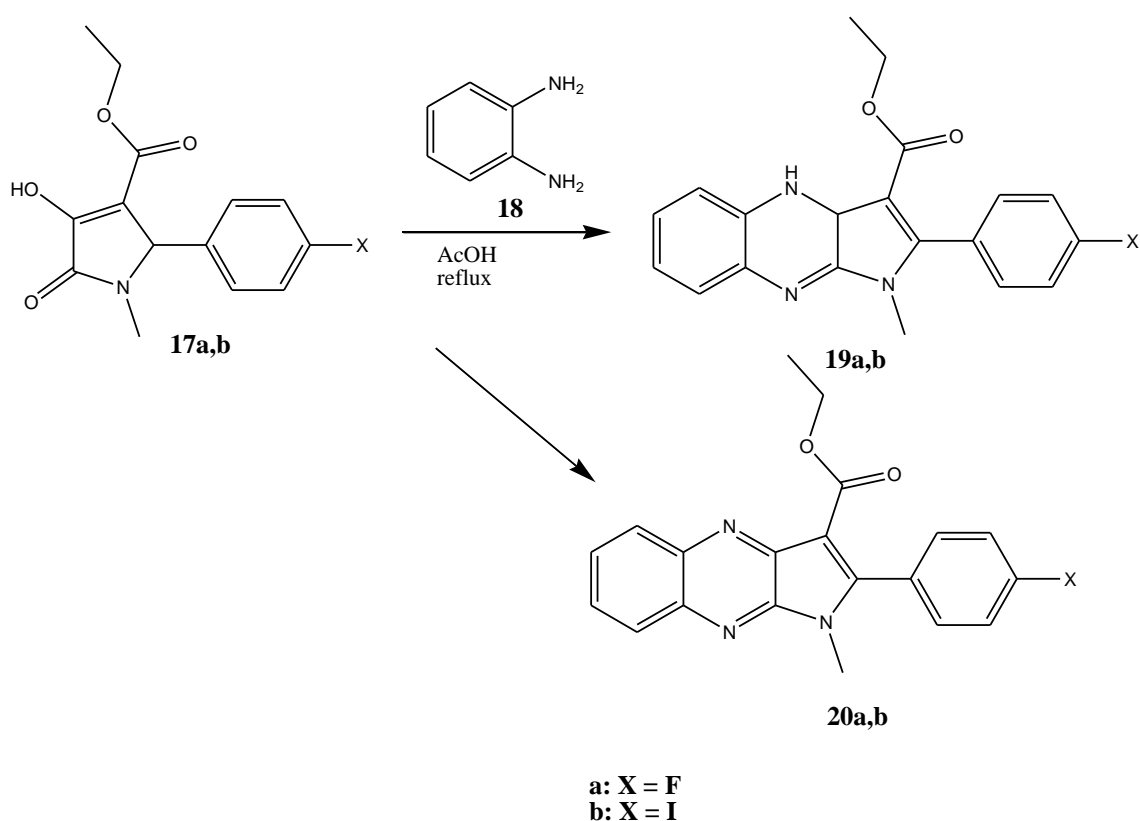
Απόδοση 49%; m.p. 136-138 °C; Rf = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH, 9.8:0.2); $[\alpha]_D^{22} = + 2.00$ (c 0.15, CHCl₃); ESI-MS (*m/z*): 280.24 ([M+H]⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.16-7.04 (m, 4H, aromatic), 4.99 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.14 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂), 2.81 (s, 3H, NCH₃), 1.14 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃)

Για X=I

Yield 54%; m.p. 146-148 °C; Rf = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH, 9.8:0.2); $[\alpha]_D^{22} = - 2.00$ (c 0.15, CHCl₃); ESI-MS (*m/z*): 388.20 ([M+H]⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.69 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, o-C₆H₄Cl), 6.92 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, m-C₆H₄Cl), 4.94 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂), 2.81 (s, 3H, NCH₃), 1.16 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃)

4.1.2 Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλοφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινολαλιν-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **19** και του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλοφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινολαλιν-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **20** μέσω σύζευξης του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **17**.

Αντίδραση:



Πρωτόκολλο:

3 mmol 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **17** απαιτούν: 3 mmol ο-φαινυλο-διαμίνης **18** και 40 ml οξικού οξέος.

Πειραματική διαδικασία:

Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **17** (0.68mmol, **X=F**: 190 mg, **X=I**: 263 mg), ο-φαινυλο-διαμίνη **18** (74mg, 0.68mmol) και οξικό οξύ (9.5 ml, 0.68 mmol). Στη φιάλη εφαρμόστηκε κάθετος ψυκτήρας και το διάλυμα θερμάνθηκε με επαναρροή για 45 λεπτά στους 130°C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC. Μετά το πέρας των 45 λεπτών, προστέθηκε στη φιάλη της αντίδρασης μεθανόλη, ώστε να απομακρυνθεί το οξικό οξύ. Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υψηλής πίεσης (HPFC) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα 7 Hexane/3 AcOEt. Το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως υποκίτρινο στερεό.

Αποτελέσματα

- αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλοφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-*b*]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρας **19**

Για X=F

Yield 51%; R_f = 0.65 (AcOEt/Hexane, 3:7); [α]_D²² = - 4.00 (c 0.15, CHCl₃); ESI-MS (*m/z*): 352.34 ([M+H]⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.16-6.77 (m, 8H, aromatic), 4.89 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.04 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂), 1.25 (s, 3H, NCH₃), 1.08 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃)

Για X=I

Yield 49%; Rf = 0.65 (AcOEt/Hexane, 3:7); $[\alpha]_D^{22} = -5.00$ (c 0.23, CHCl₃); ESI-MS (*m/z*): 460.30 ([M+H]⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.53-6.78 (m, 8H, aromatic), 4.85 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.05 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, OCH₂), 1.25 (s, 3H, NCH₃), 1.09 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₃)

- αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλοφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινοξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρας 20

Για X=F

Yield 39%; Rf = 0.35 (AcOEt/Hexane, 3:7); $[\alpha]_D^{22} = +3.00$ (c 0.25, CHCl₃); ESI-MS (*m/z*): 350.32 ([M+H]⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.40-7.51 (m, 8H, aromatic), 4.29 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂), 3.78 (s, 3H, NCH₃), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃)

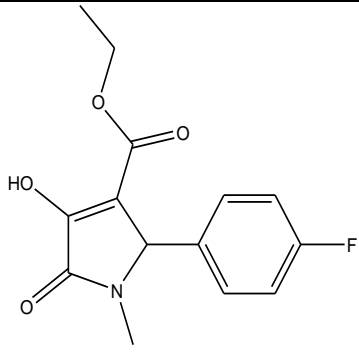
Για X=I

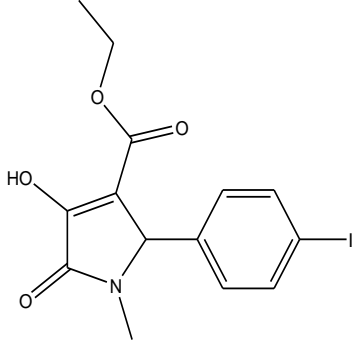
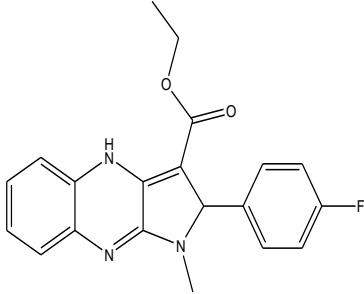
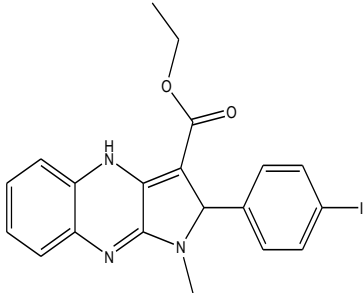
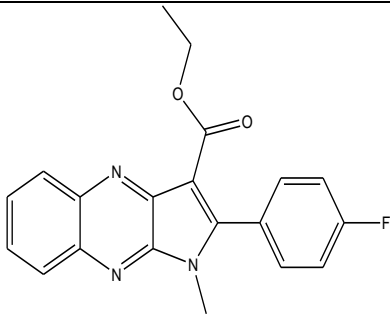
Yield 46%; Rf = 0.30 (AcOEt/Hexane, 3:7); $[\alpha]_D^{22} = +4.00$ (c 0.40, CHCl₃); ESI-MS (*m/z*): 458.29 ([M+H]⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.40-7.72 (m, 8H, aromatic), 4.29 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂), 3.77 (s, 3H, NCH₃), 1.22 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃)

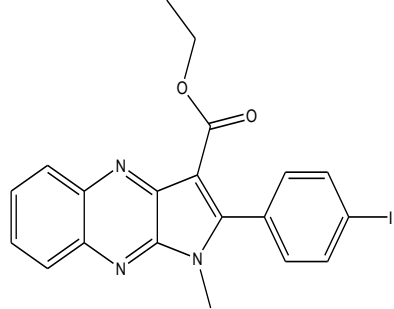
5 Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Αντιοξειδωτική δράση

Λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης του οξειδωτικού στρες, τα προϊόντα **17a,b;19a,b;** και **20a,b** αξιολογήθηκαν ως προς την in vitro αντιοξειδωτική τους δράση με τρεις διαφορετικούς τρόπους: Α) με την 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλο (DPPH) σταθερή ελεύθερη ρίζα, Β) με την υδροξυλική ρίζα (HO·) παραγόμενη από το σύστημα Fe^{3+} /ασκορβικό οξύ και Γ) ελέγχθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τον παραγωγέα ελευθέρων ριζών 2,2'-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο) διυδροχλωρίδιο (AAPH).

Ένωση	Clog P^*	RA % 100 μM 20min	RA % 100 μM 60 min	OH % 100 μM	AAPH % 100 μM
 17a	2.58	22	41	no	72

 <p>17b</p>	3.56	42	21	no	94
 <p>19a</p>	4.32	57	59	91	73
 <p>19b</p>	6.27	23	32	97	39
 <p>20a</p>	3.72	6	22	95	59

 20b	4.70	9	17	no	No
NDGA**		81	83		
trolox				73	63

* Biobyte Corp. 201 West 4th Street, Suite 204, Claremont, CA 91711, USA

****NDGA** nordihydroguaiaric acid; no results under the reported experimental conditions; each experiment was performed at least in triplicate and the standard deviation of absorbance was less than 10 % of the mean.

Πίνακας 2: Αλληλεπίδραση-Αναγωγική Δραστικότητα% με DPPH (RA%); Ικανότητα δέσμευσης υδροξυλικών ριζών OH %; % Αναστολή της Υπεροξειδωσής των Λιπιδίων (AAPH %).

A

Ο έλεγχος με DPPH είναι από τις πιο γνωστές, ευρέως χρησιμοποιούμενες και ακριβείς μεθόδους. Η αλληλεπίδραση των παραχθέντων μορίων με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH, παρουσιάζεται στον Πίνακα 2, συγκριτικά με έναν πολύ γνωστό αντιοξειδωτικό παράγοντα, το NDGA. Η αλληλεπίδραση αυτή δείχνει την ικανότητα ανεύρεσης ριζών σε σύστημα χωρίς σίδηρο. Ερευνήθηκε η μείωση του DPPH (50 μ M) με τις εξεταζόμενες ενώσεις στα 100 μ M, μετά από 20 και 60 min. Την καλύτερη ικανότητα δέσμευσης ριζών παρουσίασε η ένωση **19a** τόσο στα 20 min όσο και στα 60 min, ενώ τα αποτελέσματα στα 100 μ M εξαρτώνται από τον χρόνο για όλες τις ενώσεις εκτός της **17b**. Μικρή αύξηση μετά το πέρας 60 min παρατηρήθηκε για την ένωση **19a**. Οι τιμές % των εξεταζόμενων ενώσεων αποδείχθηκαν μικρότερες από αυτές του NDGA. Ο ρόλος του υδροξυ υποκαταστάτη του πυρρολικού δακτυλίου (**17a,17b**) καθώς και η θέση του διπλού δεσμού, δεν ήταν δυνατό να καθοριστούν.

B

Για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης υδροξυλικών ριζών των εξεταζόμενων ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνισμός των εξεταζόμενων ενώσεων με το DMSO για τις ρίζες HO[•] του συστήματος Fe³⁺/ασκορβικό οξύ, εκφραζόμενος ως % αναστολή της παραγωγής φορμαλδεΰδης. Οι ενώσεις **19a**, **19b** και **20a** παρουσίασαν πάρα πολύ καλή δραστηριότητα στα 100 μM (πιο υψηλή από αυτή του ευρέως γνωστού αντιοξειδωτικού trolox). Αντιθέτως, οι ενώσεις **17a**, **17b** και **20b** δεν παρουσίασαν δραστηριότητα.

Γ

Όσον αφορά στην αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων λόγω του AAPH, σχεδόν όλες οι ενώσεις, εκτός της **20b**, ήταν επιτυχείς. Οι ενώσεις **17a**, **17b** και **19a** επέδειξαν υψηλότερη δραστηριότητα από την αναφορική ένωση trolox, με υψηλότερη αυτή της ένωσης **17b**.

Ακόμη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ένωση **17b** με clog P 3.56 επιδεικνύει την υψηλότερη anti-LPO (αντι-λιπιδική υπεροξειδωση), ενώ η ένωση **20b** με το υψηλότερο clog P (4.70) δεν παρουσιάζει δραστηριότητα. Μεταξύ των ενώσεων **17a** και **17b** παρατηρούμε ότι αύξηση της λιποφιλικότητας ενισχύει την αντι-λιπιδική υπεροξειδωση, ειδικά η ενίσχυση της λιποφιλικής συνδρομής του αλογόνου, αυξάνει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Παρόλα αυτά, οι ενώσεις αυτές αποδείχθηκαν λιγότερο αποτελεσματικές από τις ανάλογες πυρρολο[2,3-b]κιννοξαλίνες **19a** και **19b**. Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι οι 2,3-διοξο-5-αλογονοφαινυλο πυρρόλες δεν κατάφεραν να δεσμεύσουν υδροξυλικές ρίζες, ενώ η δραστηριότητα των περισσότερων πυρρολο[2,3-b]κιννοξαλινών ήταν πολύ καλή. Έχοντας υπόψη ότι η μοναδική δομική διαφορά των ενώσεων **19a** και **19b** είναι η φύση του αλογόνου, φαίνεται ότι το πιο ογκώδες από τα δύο (I) συνδέεται με μεγαλύτερη δραστηριότητα δέσμευσης υδροξυλικών ριζών. Όσον αφορά στις ενώσεις **20a** και **20b**, φαίνεται η αρωματικότητα εξαλείφει την ικανότητα δέσμευσης, αφού μόνο η **20a** επιδεικνύει (95%) ικανότητα δέσμευσης.

5.2 Αντικαρκινική δράση

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC_{50} , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Compound	CC50* (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
17a	119 ± 1	> 250	98 ± 5
17b	21 ± 11	146 ± 25	5.8 ± 0.7
19a	93 ± 2	101 ± 11	72 ± 14
19b	51 ± 9	37 ± 1	18 ± 4
20a	176 ± 42	117 ± 51	126 ± 44
20b	34 ± 9	30 ± 19	32 ± 9
6 MP	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.3	1.1 ± 0.1
6 TG	0.94 ± 0.04	1.1 ± 0.3	0.38 ± 0.17

*50% cytostatic concentration.

Πίνακας 3: Κυτταροστατική δράση των ελεγχθέντων ενώσεων.

Καμία από τις ενώσεις που ελέγχθηκαν δεν παρουσίασε αξιόλογη αντι-καρκινική δράση ($CC_{50} \geq 20 \mu M$), με μόνη εξαίρεση την **17b** η οποία επέδειξε κυτταροστατική δράση με $CC_{50} 5.8 \mu M$ ενάντια σε κύτταρα HeLa, αλλά ήταν σημαντικά λιγότερο δραστικά ενάντια κυττάρων CEM ($CC_{50}: 146 \mu M$). Ο λόγος αυτής της διαφορετικότητας δεν είναι ξεκάθαρος, αφού η αναστολή των καρκινικών κυττάρων στις υπόλοιπες ενώσεις είχε παρόμοιες τιμές, ανεξάρτητα από φύση και τον τύπο

των καρκινικών κυττάρων. Η κυτταροστατική δράση των γνωστών αντικαρκινικών στελεχών 6-μερκαπτοπουρίνη (6 MP) και 6-θειογουανίνη (6 TG) ήταν πολύ ανώτερη (CC50: 0.38-2.8 μ M) (Πίνακας 3) από αυτή των ελεγχθέντων ενώσεων.

Όταν ελέγχθηκαν για τη δράση τους ενάντια σε μεγάλη ποικιλία ιών DNA και RNA, οι ενώσεις **17b** και **19b** επέδειξαν ανασταλτική δράση ενάντια του ιού Sindbis (EC50: 4 μ M).

Κατάλογος Ακρωνυμίων

ATRA: All-Trans-Retinoic Acid (ATRA)

CML: Chronic Myelogenous Leukemia

CT: Computed Tomography

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ER: Estrogen Receptor

HEL: human embryonic lung

MRI: Magnetic Resonance Imaging

NDGA: NorDihydroGuiaretic Acid

NSCLC: Non-Small Cell Lung Carcinoma

PDGF-R: Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PET: Positron Emission Tomography

Rf: Retardation factor

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

ROS: Reactive Oxygen Species

SPECT: Single-Photon Emission Computed Tomography

TLC: Thin Layer Chromatography

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Βιβλιογραφία

1. Helmut Sies, *Experimental Physiology*, 1997, 82, 291-295
2. Guzman M., Hirschmann R., Holcomb R.C., Keenan T., Smith A.B., Sprengeler P., Wood J.L., US Patent 5,489,692, 1996
3. Boiadjev S.E., Lightner D.A., *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 688-691
4. Armarego, W.L.F., 1963, "Quinazolines". *Advances in Heterocyclic Chemistry Volume 1*. *Advances in Heterocyclic Chemistry* 1. p. 253
5. Jean Renault, Michel Baron, Patrick Mailliet et al. (1981). "Heterocyclic quinones.2.Quinoxaline-5,6-(and 5-8)-diones-Potential antitumoral agents". *Eur. J. Med. Chem.* 16 (6),545–550
6. Xianghong Wu, Anne E. V. Gorden (2007). "Regioselective Synthesis of Asymmetrically Substituted 2-Quinoxalinol Salen Ligands". *J. Org. Chem.* 72 (23), 8691–8699.
7. Ramasamy Paulmurugan, *Molecular Imaging Probes for Cancer Research*, World Scientific Publishing, 2012, Session 1, chapter1
8. Henriksen T., Endresen M., "Oxidative stress and antioxidants", PubMed (1994)
9. Yaakob I.U., Degree of Bachelor of Science (Hons.), 2009
10. Diana P., Martorana A., Barraja P., Montalbano A., Dattolo G., Cirrincione G., Dall'Acqua F., Salvador A., Vedaldi D., Basso G., and Viola G., *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2387-2399
11. Noolvi M. N., Patel H. M., Bhardwaj V., Chauhan A., *Europ. Jour. Of Med. Chem.* 46, 2011, 2327-2346
12. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2